

Contribution à l'Etude L'Insemination Artificielle des Reines d'Abeilles et Conservation du Sperme de Faux - Bourdons

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON
(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 28 Avril 1981
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

CLAUDE GOTTARDI

né le 23 Février 1954

à CHAMBÉRY (Savoie)

Contribution à l'Etude

L'Insemination Artificielle des Reines

d'Abeilles et Conservation du Sperme

de Faux - Bourdons

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON
(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 28 Avril 1981
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

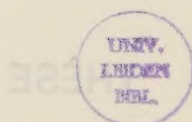
par

CLAUDE GOTTARDI

né le 23 Février 1954
à CHAMBÉRY (Savoie)

Contribution à l'Étude

L'insémination Artificielle des Reines d'Abelles et Conservation du Sperme de Faux - Bourdons



Présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON
(Médecine Parasitaire)

et soutenue publiquement le 23 Avril 1981
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

CLAUDE GOTTARDI

né le 23 Février 1954
à CHAMBERY (Savoie)

L'INSEMINATION ARTIFICIELLE DES REINES
D'ABEILLES ET CONSERVATION DU SPERME
DE FAUX - BOURDONS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553407_0020

PERSONNEL ENSEIGNANT
DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur	Monsieur le Professeur	COTTEREAU
Directeurs honoraires	Messieurs	TAPERNOUX
		FLORIO
		FROGET

Professeurs

Pharmacie - Toxicologie	M. LORGUE
Anatomie	M. BARONE
Physiologie	M. BOST
Histologie - Anatomie Pathologique	M. TISSEUR
Hygiène et industrie des Aliments d'origine animale	M. FLACHAT M. CHANTEGRELET
Parasitologie	M. EUZEBY
Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores	M. FONTAINE
Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour	M. COTTEREAU
Chirurgie	M. COULON
Obstétrique - Pathologie de la Reproduction	M. BERTRAND
Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie	M. OUDAR
Ethnologie - Zootechnie - Economie Rurale	M. FROGET
Botanique appliquée - Agronomie - Alimentation	M. JEAN BLAIN
Physique - Chimie	M. DELATOUR
Maladies Contagieuses	M. JOUBERT

Professeurs sans chaire

MM. DESCHANEL, LAPRAS, LE NIHOUANNEN,
BOIVIN, GASTELLU, PRAVE

Maître de Conférences

M. FRANCK, Mme BRUGERE

Maîtres Assistants Agrégés

MM. RICHARD, GEVREY, KECK, LEGEAY

Maîtres Assistants

Mme CHAUVE, MM. EUZEBY, FAU, GARNIER,
Mme RACHAIL, M. JAUSSAUD, Mlle COURSAT,
MM. DEMONT, DENOIX, CHOMEL

Assistants

Mme FOURNEL, M. GENIN, Mlle OLLEON
M. GRANCHER, Mme CHAPUIS, M. DROMIGNY,
Mlle MARTIN, MM. DULAC, DUCLOS, NGO TAN,
GUERIN, THIN, BOUVIER, PEPIN, THIEBAULT,
PEPIN

Examineurs de Thèse

Président : M. le Professeur BERTOYE
de la Faculté de Médecine

Premier Assesseur : M. le Professeur COTTEREAU
de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de LYON

Deuxième Assesseur : M. FRANK
de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de LYON

A ma Femme

qu'elle trouve par ce modeste
ouvrage un témoignage de mes
profonds sentiments.

A mes Parents

pour leurs sacrifices.

Qu'ils trouvent ici l'expression
de ma profonde affection.

A ma Marraine

A mes Frères

A toute ma Famille

A tous mes Amis.

A Messieurs les membres de notre Jury :

Monsieur le Professeur BERTOYE

qui nous a fait l'honneur
d'accepter la présidence
de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur COTTEREAU

qui a bien voulu accepter
notre sujet de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression
de ma sincère gratitude.

Monsieur FRANCK

qui nous a fait le grand
plaisir de siéger au jury
de notre thèse.

Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

=====

	Pages
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE PREMIER : INSEMINATION ARTIFICIELLE DANS LA GENETIQUE, LA SELECTION ET LA REPRODUCTION DE L'ABEILLE.....	5
A - Généralités.....	5
1°) Niveau actuel de l'Insémination artificielle.....	5
2°) Avantages de l'Insémination Artificielle...	5
3°) Inconvénients de l'Insémination Artificielle.....	6
4°) Avenir de l'Insémination Artificielle....	6
B - L'Insémination Artificielle en apiculture moderne.....	6
1°) Génétique apicole.....	6
a) Mutations.....	7
b) Détermination du sexe.....	7
c) Maladies des abeilles.....	10
2°) Hybridation.....	10
a) Principes et méthodes.....	10
. Hybridation de lignées d'abeilles de même race.....	11
. Hybridation de différentes races géographiques d'abeilles.....	11
b) Intérêts variabilité de la production..	11
c) Inconvénients - Contrôle génétique des hybrides inter raciaux.....	14
CHAPITRE DEUXIEME : RECOLTE - EXAMEN - CONSERVATION DU SPERME.....	17
A - Récolte.....	17
1°) Rappels anatomiques de la Reine et du Faux bourdon.....	17
a) Organes de reproduction de la Reine...	17
. La chambre de l'aiguillon et le vestibule vaginal.....	17
. le vagin.....	17
. l'oviducte.....	17
. la spermathèque.....	18

b) Organes de reproduction du mâle.....	18
. l'organe de copulation.....	18
. Testicules et glandes muqueuses.....	19
2°) Instrumentation.....	19
3°) Technique de collecte.....	20
4°) Les problèmes rencontrés.....	21
a) le remplissage.....	21
b) les maladies.....	21
B - Examen.....	26
1°) Couleur.....	26
2°) Numération et concentration.....	26
a) Technique avec l'hématimètre.....	26
b) Technique avec le spectrophotomètre...	26
c) Résultats.....	27
3°) Motilité - Mobilité - Action de différents facteurs.....	27
a) Motilité - Mobilité chez le mâle.....	27
b) Motilité des spermatozoïdes chez la femelle.....	27
c) Mobilité des spermatozoïdes lors d'expérimentation.....	27
. sur le plan optique.....	28
. sur le plan physiologique.....	28
- le manque d'oxygène.....	28
- le manque de substrats utilisables	28
- la présence de métaux lourds.....	28
- les ions Na^+ et K^+	28
4°) Pourcentage de morts et de vivants.....	29
5°) Constitution du sperme.....	29
a) P H.....	29
b) Composition.....	29
. les sucres.....	29
. les acides aminés.....	30
. deshydrogénases.....	30
. les lipides.....	30
c) Structure des spermatozoïdes.....	34
. Introduction.....	34
. Méthode et matériel.....	34

. Résultats.....	34
- Microscope optique.....	34
- Microscope électronique.....	34
* Morphologie générale.....	34
* Acrosome.....	35
* Noyau.....	35
* Queue.....	36
d) Métabolisme.....	38
. Coefficient respiratoire du sperme d'abeille.....	38
. Motilité et métabolisme du sperme pendant le stockage in vitro.....	38
. La densité des spermatozoïdes de la spermathèque et l'effet de la dilution.....	38
. Effet des cations sur la respiration des spermatozoïdes.....	39
6°) Qualités bactériologiques du sperme....	39
C - Conservation.....	41
1°) Dans la spermathèque.....	41
a) Composition du sperme.....	41
b) Structure et biochimie de la spermathèque.....	41
c) Liquide de la spermathèque.....	42
d) Motilité et métabolisme du sperme dans la spermathèque.....	42
. Le manque d'oxygène.....	42
. Le manque de substrat utilisable..	43
. Le gaz carbonique et le PH.....	43
. La présence de métaux lourds.....	43
. Densité du sperme et effets de dilution.....	43
. Les concentrations en Na ⁺ et K ⁺ ...	43
2°) Artificielle.....	44
a) 1ère méthode.....	44
. Sans solvant.....	44
- Matériels méthodes.....	45
- Résultats.....	45
- Discussion.....	46
. Avec solvant.....	46

b) 2ème méthode.....	47
. Point de vue des chercheurs américains.....	47
- Protection du sperme et des spermatozoïdes.....	47
- Tolérance du sperme au froid intense.....	48
. Point de vue des chercheurs soviétiques.....	49

CHAPITRE TROISIEME : TECHNOLOGIE DE L'INSEMINATION ARTIFICIELLE.....	54
A - Appareil d'Insémination Artificielle.....	54
B - Technique.....	55
1°) Préparation.....	55
a) de l'anesthésique.....	55
b) de la seringue.....	55
c) de la reine.....	56
2°) Remplissage de la seringue.....	61
3°) Injection.....	61
4°) Conditions aseptiques du travail.....	64
5°) Emploi de gaz carbonique.....	64
6°) Techniques complémentaires.....	65
a) Insémination des reines en cours de ponte.....	65
b) Insémination avec du sperme provenant d'une spermathèque.....	65
c) Sperme provenant de vésicules séminales.....	65
C - Résultats.....	65
1°) Nombre de reines pondeuses après insémination.....	65
2°) Degré de remplissage de la spermathèque	66
3°) Rendement en miel et longévité.....	66
CONCLUSION.....	68
BIBLIOGRAPHIE.....	70

I N T R O D U C T I O N

DEFINITION

L'Insémination Artificielle est une technique qui consiste à récolter du sperme sur plusieurs mâles et à injecter après examen, et éventuellement conservation, plusieurs éjaculats dans l'appareil génital d'une reine, vierge ou ayant déjà été fécondée.

IMPORTANCE

L'Insémination Artificielle des reines d'abeilles est devenue une technique de routine indispensable aux travaux de sélection et aux recherches sur la génétique de l'abeille. Depuis quelques années, cette méthode s'est considérablement développée et se trouve maintenant introduite en maints endroits dans la pratique apicole. L'introduction de cette technique est accélérée par une nette prise de conscience des difficultés et de l'incertitude qui pèsent sur tout contrôle de l'accouplement naturel. Il apparaît donc très nettement que sans contrôle "strict" de l'accouplement, la sélection de l'abeille n'est pas possible.

HISTORIQUE

Les méthodes d'insémination ont évolué selon deux conceptions :

- . Introduction directe de l'organe de copulation du mâle dans les voies génitales de la Reine :

c'est l'insémination manuelle

- . Introduction du sperme dans les voies génitales de la Reine à l'aide d'instruments :

c'est l'insémination instrumentale

Il semble que seule la seconde méthode ait trouvé des résultats encourageants.

- F. HUBER (1788.91) fut le premier à tenter l'insémination instrumentale en se servant d'un pinceau pour essayer d'introduire le sperme dans le vagin de la Reine.

- D'autres auteurs tentèrent d'introduire le sperme au moyen d'une seringue, mais sans résultat.

- WATSON (1927) utilisa une microseringue fixée sur un micromanipulateur, la Reine étant attachée avec des fils de soie sur un support de bois. Il obtint quelques résultats.

- LAIDLAW (1944) découvrit le rôle de la valvule vaginale : le sperme doit être injecté derrière cette valvule, dans l'oviducte. Il utilisa très tôt le gaz carbonique comme anesthésique.

- MACKENSEN et ROBERTS ont beaucoup contribué à l'amélioration de la technique : en 1948, ils ont amélioré la contention de la Reine ainsi que les crochets maintenant ouvert l'orifice vaginal. Les auteurs ont également montré qu'une narcose deux ou trois fois renouvelée accélère l'oviposition de la Reine.

- VESELY (1960) modifia la pointe de la seringue.

- RUTTNER (1964) améliora le logement de la Reine.

- RUTTNER, SCHNEIDER et FRESNAYS mettent au point le modèle standard de l'appareil d'Insémination Artificielle.

Actuellement, de nombreuses recherches sont faites sur la conservation des spermatozoïdes et les problèmes liés à cette conservation.

- o o o -

CHAPITRE PREMIER
=====

L'INSEMINATION ARTIFICIELLE DANS LA GENETIQUE, LA SELECTION ET LA REPRODUCTION DE L'ABEILLE

- - - - -

A - Généralités

Bien que les apiculteurs portent un intérêt de plus en plus vif à l'insémination Artificielle, peu d'entre eux ont une expérience d'insémination contrôlée, et trop comptent sur des bénéfices élevés. Bon nombre d'apiculteurs pensent également que l'Insémination Artificielle n'est pas pratique et que les performances des Reines inséminées sont moins bonnes que les Reines fécondées naturellement.

En fait, l'Insémination Artificielle n'est qu'un accouplement contrôlé rigoureusement. Sa valeur réside seulement dans l'utilisation qu'on lui réserve et elle est identique à tout accouplement contrôlé de n'importe quel organisme. L'Insémination Artificielle est une réalité et il faut l'aborder sous son aspect pratique.

1°) Niveau actuel de l'Insémination Artificielle

Du point de vue technique, on peut dire que l'Insémination Artificielle des reines a presque atteint la perfection : les blessures chez les reines inséminées sont très rares.

Du point de vue économique, un technicien averti peut, s'il dispose d'un nombre de faux bourdons suffisant, facilement inséminer 10 reines en une heure. L'opération s'avère donc tout à fait rentable.

2°) Avantages de l'Insémination Artificielle

On se demande souvent quels peuvent être les avantages de l'Insémination Artificielle par rapport à l'accouplement libre. Elle a des avantages certains de divers ordres. Elle constitue une partie intégrante et essentielle des schémas d'amélioration et d'études génétiques de l'abeille. Elle est importante pour des reines utilisées dans des ruches de production dans lesquelles prime le rendement en miel. Les reines inséminées artificiellement peuvent être préparées tôt dans la saison pour être introduites dans la colonie à une date prédéterminée.

Les schémas de sélection et d'élevage des reines donnent des résultats favorables si l'on accouple des reines vierges provenant de mères sélectionnées avec des faux bourdons sélectionnés.

Les pertes de reines écloses dans les nucléi et réintroduites dans les nucléi après Insémination Artificielle sont plus réduites que celles des reines retournées dans les nucléi après accouplement libre.

3°) Inconvénients de l'Insémination Artificielle

Pourquoi les apiculteurs utilisent-ils peu ou pas l'Insémination Artificielle dans leur rucher ?

Les éleveurs de reines ne sont pas convaincus du caractère pratique de l'Insémination Artificielle. Le laboratoire est toujours considéré avec réserve par les apiculteurs. De plus, l'Insémination Artificielle à grande échelle suppose une complexité d'opérations par rapport aux techniques actuelles d'élevage qui nécessitent une coordination et un contrôle rapides. L'Insémination Artificielle peut causer des dommages au cheptel si l'apiculteur ne possède pas de connaissances de génétique et d'élevage.

4°) Avenir de l'Insémination Artificielle

La lenteur et la prudence des apiculteurs dans l'acceptation de l'Insémination Artificielle appliquée à grande échelle sont compréhensibles : l'apiculteur doit être prudent lorsqu'il opte pour des changements majeurs dans son rucher. Il doit tout d'abord utiliser l'Insémination Artificielle en proportions réduites.

Il en résulte que l'Insémination Artificielle est un instrument très efficace pour l'amélioration du fonds d'élevage. Quand le laboratoire est prêt pour les inséminations artificielles, et quand les autres opérations spécialisées associées d'élevage de maturation des faux bourdons et de soins des reines après Insémination Artificielle sont bien connues, il est relativement aisé d'augmenter la production de reines inséminées artificiellement. Apprendre et effectuer des Inséminations Artificielles sont choses faciles, mais elles nécessitent une précision que beaucoup considèrent comme insupportable : aussi, la plupart des apiculteurs pratiquent-ils l'élevage des abeilles en refusant l'utilisation du microscope. Des groupes restreints d'apiculteurs constitueront probablement des centres d'Insémination Artificielle et fourniront des reines aux apiculteurs. De tels centres devraient fournir des reines hybrides, et construire les schémas d'amélioration des matériels avec l'assistance des spécialistes de la génétique et de l'élevage.

B - L'Insémination Artificielle en apiculture moderne

1°) Génétique apicole

Parler de génétique apicole ne peut s'envisager que dans la mesure où

l'on peut assurer pleinement un contrôle rigoureux de l'accouplement à l'aide de l'Insémination Artificielle. Les observations anciennes, bien que nombreuses, ne remplacent pas des expériences précises. Depuis la mise au point de ces nouveaux moyens techniques, nous avons des résultats biologiques de portée générale. Ils se rapportent en particulier aux recherches sur les mutations, la détermination du sexe, et les problèmes de sélection.

a) Mutations

Depuis que l'on réalise avec succès les Inséminations Artificielles, nous connaissons un bon nombre de mutations chez l'abeille. Les altérations que nous avons relevées affectent la couleur, la forme et la taille de l'oeil, la couleur du corps, les ailes, la pilosité. La plupart des mutations sont récessives. Suivant l'individu affecté, deux cas peuvent se produire :

- . la mutation apparaît dans le sexe mâle : il n'y a qu'un mâle qui montrera le caractère correspondant ; nous conserverons ce gène en inséminant artificiellement une reine avec le sperme de ce mâle.
- . la reine porte le gène mutant : s'il est récessif, la reine, les abeilles et une moitié des mâles seront normaux ; l'autre moitié des mâles sera anormale ; on disposera alors d'une quantité de sperme suffisante pour conserver le caractère.

Les descriptions les plus fréquentes portent sur les yeux car ce sont les plus frappantes. On parle très souvent de mâles albinos ou "yeux blancs". Certains gènes, en particulier pearl et cream dont le pourcentage de recombinaison est de 33 % , font l'objet d'études poussées par les chercheurs de l'I.N.R.A. Ce sujet sera développé ultérieurement. Si certains caractères commencent à être bien connus, d'autres sont encore très énigmatiques ; la cyclopie et la gynandromorphie déroutent les chercheurs en ce qui concerne leur support génétique et leur mécanisme de transmission.

b) Détermination du sexe

La biologie étudie des problèmes très intéressants dont l'un, sans doute parmi les plus attrayants, est la question de la différenciation des sexes. Les particularités propres à l'abeille ont été beaucoup discutées à cause de leur signification essentielle pour les théories en cours ; il faut donc se replacer dans un cadre général.

Malgré des modes de différenciation du sexe très nombreux, l'observation des organismes diploïdes fait apparaître un principe de base relativement unique d'où se dégagent aisément des applications spéciales :

. chaque organisme diploïde présente une unipotentialité bisexuelle, à savoir qu'il peut orienter facultativement ses possibilités de développement dans le sens d'un sexe ou de l'autre (HARTMANN 1956, GOLDSCHMIDT 1955).

. les facteurs du sexe, se révélant être mendéliens dans les expériences de génétique, orientent le choix vers l'une des deux potentialités. L'hérédité suit le schéma de l'homo-hétérozygotie : suivant un rétro croisement simple $aa \times ab$ le rapport des sexes I/I se trouve garanti. Les facteurs du système d'homo-hétérozygotie se trouvent fréquemment dans un chromosome déterminé, appelé chromosome X.

Le schéma de base général peut se modifier de différentes façons. Dans l'éventualité d'une hétérogamétie mâle et dans un cas simple on constate l'intervention d'une seule paire de facteurs : $MF = \text{mâle}$
 $FF = \text{femelle}$. Dans de nombreux cas, il est nécessaire de supposer deux paires de facteurs pour éclairer les rapports des sexes l'un à l'autre : une paire de facteurs femelles F dans le chromosome X, des facteurs mâles M dans l'autosome et qui sont toujours présents à l'état homozygotie. La réalisation d'un sexe dépend du rapport quantitatif des facteurs M et F . Dans le cas d'une hétérogamétie mâle, on pose $FF > MM$ et $Ff < MM$.

La constitution FF , NM donne une femelle et Ff , NM un mâle. Il est vraisemblable que le facteur F consiste en un complexe génétique localisé dans le chromosome X. On explique des cas complexes de détermination du sexe avec des proportions différentes de la proportion I/I par une polygénie à libres combinaisons de facteurs du sexe ou par des mécanismes spéciaux de la division réductionnelle. Admettre l'haploïde comme le facteur causal de la réalisation du sexe évince les organismes à parthénogénèse arrhénotoque de cette conception de base. L'équilibre entre F et M ne se déplacera pas après doublement du stock chromosomique.

Pour tenter d'éclairer la détermination du sexe sur la base des échanges diploïde - haploïde, on suppose une action accumulative du facteur F (DA CUNHA et KERR 1955). Si à l'état diploïde les valences des facteurs M ne s'additionnent pas $M + M = 2$ alors que les facteurs F le font $F + F = 3 F$ il en résulte une modification de l'équilibre génétique. A l'état haploïde, on obtient une détermination dans le sens mâle où $M < F$ au contraire à l'état diploïde une détermination dans le sens femelle où $2 F > M$.

Chez les hyménoptères on a découvert 2 autres modes de détermination du sexe :

. chez les guêpes parasites Télénomuns Fariai les femelles sont hétérogamétiques avec chromosome X et Y qu'on peut distinguer par leur morphologie (DREYUS et BREUER 1944). Les mâles haploïdes, possèdent un chromosome X dans toutes les cellules somatiques, y compris les spermatogonies. Puis lors de la spermatogénèse le chromosome X se transforme en chromosome Y par perte d'un fragment. On admet qu'au cours de l'ovogénèse le chromosome Y est toujours éliminé avec le globe polaire par naturation différentielle, si bien que le pronucléus de l'oeuf contient toujours un X.

On constate qu'il y a une brusque diminution de couvain au moment de l'éclosion, puis cette baisse disparaît après le onzième jour (tableau 1 p. 208 T4).

La mortalité des homozygotes pendant le stade larvaire n'est pas due à une influence létale, mais, selon WOYKE, au fait que ces larves sont dévorées par les nourrices. On ne peut attribuer ce comportement à la forme de la cellule, mais peut-être au fait que les nourrices reconnaissent les abeilles anormales. Comme on sait reconnaître le sexe des larves âgées de 3 à 6 heures, on fait éclore à l'étuve des oeufs prélevés dans des cellules d'ouvrières et provenant de reines consanguines ; on constate que l'on trouve 50,7 % de femelles et 49,3 % de mâles. Quelques-unes sont complètement développées et WOYKE (1965) a pu prouvé l'origine biparentale par un gène marqueur. Leur poids corporel était anormalement élevé quoique les testicules fussent réduits. Après un tel résultat, il semble que la théorie de l'allèle du sexe soit démontrée.

c) Maladies des abeilles

Bien avant l'avènement de l'insémination Artificielle, de nombreux auteurs avaient constaté que la résistance à la loque américaine était héréditaire.

On a pu approfondir cette question grâce à l'Insémination Artificielle. La survie de larves inoculées par des spores de loque américaine varie selon les lignées ; il en est de même pour le temps de germination des spores. Les abeilles adultes, de lignées génétiques différentes, protègent les larves à des degrés différents. On constate que toutes ces variations sont héréditaires.

2°) Hybridation

a) Principes et Méthodes

L'une des principales préoccupations de l'apiculteur, surtout dans nos régions, est l'augmentation de la récolte du miel. Augmenter le rendement en miel des colonies ne peut se faire que par l'amélioration des qualités de l'abeille, amélioration réalisée par la sélection ou l'hybridation. BORNUS et AVETISSIAN ont travaillé sur la sélection de races pures, tandis que RUTTNER, FRESNAYE et WITHEREL, entre autres, ont travaillé sur l'effet d'hétérosis en hybridation. Une hybridation passe avant tout par la sélection de différentes races pures.

La sélection d'une race d'abeilles revêt plusieurs aspects. Il est facile et efficace de sélectionner des caractères morphologiques, mais cette sélection est d'un intérêt pratique très restreint. En revanche, la sélection de caractères fondamentaux pour l'apiculteur, tels que le rendement en miel, la douceur des abeilles, la résistance aux maladies, l'adaptation au climat et à la flore, est difficile et donne des résultats très lents.

L'hybridation peut être envisagée à deux niveaux :

. Hybridation de lignées d'abeilles de même race

Des lignées à rendement élevé sont sélectionnées, maintenues dans un certain état de consanguinité et croisées entre elles en vue d'obtenir un effet d'hétérosis maximal : on constate une augmentation sensible de la récolte de miel de l'ordre de 30 à 40 %.

. Hybridation de différentes races géographiques d'abeilles

L'hybridation "scientifique" et contrôlée de races d'abeilles adéquates pose des problèmes :

- il faut rechercher les races donnant la meilleure hétérosis par leurs croisements. D'après RUTTNER, les croisements *Apis cypria* x *Apis carnica* *Apis mellifica* x *Apis caucasica* ne sont d'aucun intérêt dans la recherche de l'hétérosis. En revanche dans le croisement *Apis ligustica* x *Apis caucasica* et *Apis mellifica* x *Apis caucasica*, l'augmentation de la récolte est de 40 à 50 % pour F₁. L'hétérosis la plus importante est obtenue actuellement par l'hybridation de trois races d'abeilles différentes, à savoir (*ligustica* x *caucasica*) x *mellifica*.
- il faut également rechercher, à l'intérieur même d'une race, des lignées ayant la plus forte hétérosis.
- mais des réserves géographiques importantes sont nécessaires pour assurer la protection de la race pure locale. Elles seraient fermées à toute introduction de races hybrides ou étrangères. En ce qui concerne l'expérimentation, les hybrides testés et les témoins de race locale doivent être en même nombre et soumis aux mêmes conditions.

b) Intérêts variabilité de la production

Les intérêts sont représentés par les différents résultats obtenus au cours des expérimentations.

TABLEAU n° 1

Résultats des expériences conduites pendant 6 ans en Provence
comprenant des groupes d'hybrides (*ligustica* x *caucasica*) x *mellifica*
et des témoins *mellifica* (ecotype Provence)

Tableau tiré des Editions Apimondia BUCAREST 1977

année	âge de reines	Type de l'essai	n. ruches	rendement moyen	%	V %	F calculé — table
1970	1	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	7	33,2	272	22,1	33,92 > 8,86
	1		9	12,2	100	55,8	(seuil 1%)
1971	1	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	10	25,0	217	14,8	77,92 > 8,26
	1		10	11,3	100	26,9	(seuil 1%)
1972	1	(ligustica x caucasica) x mellifica I	11	59,0	177	14,9	23,85 > 5,25
							(seuil 1%)
	1	(ligustica x caucasica) x mellifica II témoins (mellifica)	12	55,8	168	28,8	
	1		17	33,2	100	21,4	
	2	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	10	54,9	183	24,0	15,02 > 8,86
	2		6	30,0	100	36,2	(seuil 1%)
1973	1	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	13	46,4	157	34,0	14,28 > 7,50
	1		21	29,4	100	35,4	(seuil 1%)
	2	(ligustica x caucasica) x mellifica I	9	41,0	324	21,3	61,22 > 5,57
							(seuil 1%)
	2	(ligustica x caucasica) x mellifica II témoins (mellifica)	8	45,6	361	19,7	
	2		11	12,6	100	39,9	
1974	1	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	10	30,2	195	44,0	11,60 > 8,02
	1		13	15,4	100	46,0	(seuil 1%)
	2	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	5	30,0	188	29,0	10,63 > 8,86
	2		11	13,9	100	48,0	(seuil 1%)
1975	2	(ligustica x caucasica) x mellifica témoins (mellifica)	7	28,7	281	28,0	33,72 > 8,86
	2		9	10,2	100	46,0	(seuil 1%)
Nombre total des ruches							269
Rendement moyen des hybrides (ligustica X caucasica) X mellifica							40,8 Kg
Rendement moyen des témoins (mellifica)							18,9 Kg
Pourcentage moyen des hybrides comparé aux témoins							229 %
Coefficient de variation (V%) moyen des hybrides							83,3 %
Coefficient de variation (V%) moyen des témoins							39,5 %

TABLEAU n° 2

Résultats des expériences conduites pendant 2 ans dans le bassin
parasien, comprenant des groupes d'hybrides (*ligustica* x *caucasica*)
x *mélifica* et des témoins *mélifica* (ecotype Bassin Parisien)

Tableau tiré des Editions Apimondia DUCAREST 1977

année	âge des reines	Type de l'essai	n. ruches	rendement moyen	%	V %	calculé — table F F
1973	1	<i>(ligustica</i> x <i>caucasica</i>) x	7	39,0	154	56	1,41 < 4,75 (seuil 5%)
	1	<i>mélifica</i> témoins (<i>mélifica</i>)	7	25,2	100	79	
1974	1	<i>(ligustica</i> x <i>caucasica</i>) x	14	44,9	191	49	12,20 > 7,64 (seuil 1%)
	1	<i>mélifica</i> témoins (<i>mélifica</i>)	16	23,4	100	43	

Les résultats de ces expérimentations vérifient l'hypothèse selon laquelle les individus hétérozygotes et les hybrides inter - raciaux sont moins variables pour leurs caractères biométriques ou physiologiques, que les individus de race pure (T1 et T2). Ces phénomènes d'homéostasie intéressent également les caractéristiques des "produits" des organismes. On constate une diminution très sensible du coefficient de variation du rendement en miel chez les hybrides. Une augmentation du rendement en miel entraîne une diminution du coefficient de variation. En outre, on note que plus les conditions de miellée sont favorables, plus la différence entre témoins et hybrides s'atténue en ce qui concerne le rendement en miel.

L'affaiblissement de l'hétérosis au cours des générations F1, F2, F3... se confirme chez l'abeille comme dans d'autres espèces. On obtient très rapidement des rendements infimes : il faut donc mettre en garde les apiculteurs ayant des "triples hybrides INRA" en leur spécifiant bien que tout élevage de reines à partir de ces hybrides leur apporterait les pires déboires.

c) Inconvénients - Contrôle génétique des hybrides inter raciaux

L'intérêt des colonies hybrides ne fait aucun doute, mais leur diffusion risque d'entraîner une pollution génétique des populations d'abeilles locales. Il est souhaitable de limiter au maximum cette pollution et ceci pour plusieurs raisons :

- . l'introduction de colonies hybrides dans un secteur intact risque de nuire aux apiculteurs en faisant apparaître des hybrides incontrôlés dans leur cheptel.
- . les populations locales constituent des réserves de gènes co-adaptés qu'il faut absolument conserver. La pollution génétique se fait essentiellement par les mâles issus de reines hybrides. Le contrôle mécanique de la sortie des mâles s'étant avéré nuisible pour les ouvrières, les chercheurs de l' INRA se sont orientés vers un contrôle génétique.
Le principe de la méthode repose sur l'utilisation de mutations rendant les mâles inaptes à féconder les reines. Il faut un maximum de mâles porteurs d'une mutation au moins et des ouvrières hybrides parfaitement normales.

Les mutations possibles doivent répondre à plusieurs exigences :

- elles doivent être récessives
- les gènes doivent être liés et le plus près possible l'un de l'autre
- chaque mutation doit empêcher la fécondation des reines
- les mutations ne doivent affecter ni les organes génitaux, ni les gamètes des deux sexes, ni le comportement de ponte de la reine.

Les mutations "pearl" et "cream" semblent remplir ces conditions. Les homozygotes sont aveugles, donc incapables de se repérer en vol et de s'accoupler naturellement. Si l'utilisation de telles mutations est possible, la pollution génétique sera divisée par 600.

- o o o -

CHAPITRE DEUXIEME

=====

RECOLTE EXAMEN CONSERVATION DU SPERME

- - - - -

A - Récolte

1°) Rappels anatomiques de la Reine et du Faux bourdon

a) Organes de reproduction de la Reine

. La chambre de l'aiguillon et le vestibule vaginal

(Bursa copulatrix)

L'orifice abdominal met en relation avec l'extérieur deux poches : l'une supérieure et superficielle dans laquelle on peut voir l'anus, l'autre inférieure et plus profonde comportant l'aiguillon et l'orifice vaginal. Pour rendre visibles ces deux orifices, il suffit d'écarter les derniers sternites et tergites de la reine et de mobiliser l'appareil vulnérant tout entier. Après ouverture de l'orifice abdominal, on remarque un triangle isocèle formé par deux replis tégumentaires et par l'aiguillon et qui circonscrit un espace appelé vestibule vaginal. Ce dernier comporte trois orifices au centre, le vagin, et deux fentes latérales correspondant aux deux poches latérales.

. Le vagin

Il est limité crânialement par l'oviducte médian, caudalement par l'orifice vaginal (0,65 mm diamètre). La paroi très extensible présente de nombreux replis d'où un aspect très polymorphe du vagin. On peut le diviser en plusieurs portions :

- le passage vaginal, court et étroit se raccordant à l'orifice vaginal
- la chambre vaginale, élargissement en forme de sac, recevant le canal de raccordement à la spermathèque
- la valvule vaginale, repli de tissu strié contrôlant l'accès à l'oviducte. Son importance est très grande lors de l'accouplement.

. L'oviducte

Il est en forme de Y. On distingue :

- l'oviducte médian, très puissamment musclé. Son ouverture antérieure a un diamètre de 0,33 mm, son ouverture postérieure est presque nulle. L'oeuf de diamètre 0,40 mm subit une déformation lors de son passage.
- les oviductes latéraux font suite aux ovaires et se rejoignent pour former l'oviducte médian.

. La spermathèque

Elle se trouve en position dorsale par rapport au vagin. Elle apparaît très luisante à la dissection du fait d'un très grand réseau de trachées qui l'approvisionnent en oxygène. Elle est liée à l'oviducte par le "ductus spermaticus". Elle est coiffée par deux glandes dont la sécrétion active et nourrit les spermatozoïdes. Le contenu de la spermathèque, clair chez la reine vierge, est plus ou moins marbré chez la reine fécondée : on apprécie ainsi le degré de remplissage de la spermathèque.

Lors de la copulation naturelle, la reine participe activement au remplissage de l'oviducte par le sperme.

Dans l'insémination Artificielle, la valvule vaginale et l'aspect particulier du vagin sont des obstacles qu'il faut écarter. A l'aide d'une sonde on pousse la valvule vaginale, puis on pousse l'extrémité de la seringue dans l'orifice de l'oviducte médian. Pour que l'opération réussisse, il faut absolument que la reine soit dans une position irréprochable ; si tel n'était pas le cas, le sperme serait refoulé vers l'extérieur. Le remplissage de la spermathèque se fait par des contractions de l'abdomen. La valvule vaginale empêche en partie le sperme de sortir, mais, étant donné le faible diamètre du "ductus spermaticus", (0,01 à 0,025 mm) 4/5 du sperme ne pénètrent pas.

D'après des travaux récents (G. KOENIGER 1970) et (B. GESSNER et F. RUTNER 1977) il semble que les spermatozoïdes soient activés par la sécrétion des glandes de la spermathèque.

La spermathèque, réalisation extraordinaire, permet le stockage pendant plusieurs années sans aucune altération.

b) Les organes de reproduction du mâle

. L'organe de copulation

Les faux bourdons, contrairement aux autres insectes mâles ont un pénis reporté à l'intérieur de l'abdomen : c'est l'endophallus (Fig n° 3). Cet organe sacciforme, invaginé en S dans l'abdomen est lié aux testicules et aux glandes muqueuses par un long canal éjaculateur.

Pour apprécier la forme de l'endophallus, il faut l'extérioriser complètement, pour ce faire on presse sur l'abdomen et on obtient un organe

dont l'extrémité est courbée vers l'avant et le haut (Fig n° 4).

De l'avant vers l'arrière, on distingue plusieurs parties :

- deux plaquettes chitineuses d'obstruction, l'une supérieure l'autre inférieure
- le vestibule à la base duquel deux cornues font saillie
- le col ou cervix
- l'appendice élastique situé dorsalement
- le bulbe au sommet duquel on voit une boule de mucus couverte de sperme.

. Testicules et glandes muqueuses

Les testicules, mous, spongieux, longs de 6 mm, de couleur crème sont très antérieurs dans l'abdomen. Aux testicules font suite les canaux déférents en forme de S puis les vésicules séminales. La paroi des canaux déférents très musculeuse, sécrète un liquide nutritif pour les spermatozoïdes.

Les glandes séminales, liées entre elles, sont en forme de U.

Les mâles ne sont pas sexuellement mûrs dès la naissance. Les spermatozoïdes ne migrent qu'après 2 ou 3 jours. Au bout de 8 jours, les vésicules séminales sont pleines de spermatozoïdes mais le sperme que l'on obtient est immature et blanc. Ce n'est que vers le 12^{ème} 15^{ème} jour que le sperme obtenu est jaune crème et non mélangé de mucus.

2°) Instrumentation

Pour récolter le sperme, on utilise les mêmes appareils que pour l'Insémination Artificielle, car il s'écoule généralement très peu de temps entre le prélèvement et l'insémination.

La seringue la plus fréquemment utilisée a été mise au point par MACKENSEN en 1948 (Fig n° 5). D'une très grande simplicité, cette seringue permet d'aspirer ou d'injecter le sperme par mouvements d'une colonne de liquide. Elle est composée :

- d'un tube métallique fileté intérieurement à ses deux extrémités
- un piston métallique pouvant se visser
- une tige mobile mobilisée par le piston métallique
- un manchon raccord

- un joint

- une pointe en plexiglas.

Avant de fixer la pointe en plexiglas, on remplit d'eau physiologique l'espace devant la recevoir. On visse la pointe, puis par rotation du piston métallique on peut aspirer le sperme dans la pointe ou l'en éjecter.

La pointe de MACKENSEN graduée a une contenance de 10 micro l, l'extrémité antérieure a un diamètre de 0,25 mm.

Il existe des pointes (LAIDLAW 1957) Uhl en verre : elles sont moins chères, plus fines, mais cassantes et difficiles à roder.

La seringue, placée dans une gouttière prévue à cet effet est déplacée par une crémaillère micrométrique. L'inclinaison de la pointe est corrigée par une vis micrométrique.

Pour la récolte du sperme, nous n'utilisons que le bloc seringue et la seringue montée. Le travail se fait le plus souvent sous loupe binoculaire.

3°) Technique de collecte

Cette technique se borne au remplissage de la seringue précédemment citée. Afin de faciliter l'érection et l'éjaculation, on saisit le mâle entre le pouce et l'index de la main gauche sa face ventrale étant tournée vers le haut. Tandis que la main gauche serre la tête et la partie antérieure du thorax, la main droite serre légèrement et à plusieurs reprises la partie dorsale de l'abdomen. On sent très bien les contractions spasmodiques de l'abdomen amenant à l'érection puis l'éjaculation.

Le résultat de cette technique est très variable suivant les mâles :

- pour certains, le simple fait de les prendre les fera éjaculer
- pour d'autres, l'érection ne sera que partielle ; pour l'achever et obtenir l'éjaculation il faudra presser l'abdomen de la partie dorso-antérieure vers la partie ventro-postérieure.

Il existe de nombreuses modalités facilitant l'érection et l'éjaculation. Certains opérateurs décapitent les faux bourdons, et d'autres les anesthésient au chloroforme ; d'autres enfin les encagent et les laissent voler contre une plaque de verre. Il semble en fait que le choix d'une méthode soit une manière personnelle de travailler.

La quantité de sperme est fonction de l'état de maturité des mâles : il semble que plus les mâles sont jeunes, moins ils ont de sperme. Au cours de l'éjaculation apparaît d'abord le sperme de couleur crème, puis du mucus blanc plus épais.

Une fois l'éjaculation terminée, on procède à la récolte proprement dite. Pour cela, on approche délicatement le mâle avec la main gauche tout près de la seringue ; de la main droite on crée un espace d'air entre le sperme et la colonne de liquide afin de ne pas diluer le sperme. Puis on aspire le sperme en prenant bien garde de ne pas obstruer la seringue avec le mucus sous jacent. La quantité de sperme recueillie est de l'ordre de 1mm^3 par mâle.

4°) Les problèmes rencontrés

a) Le remplissage

Le principal obstacle au bon remplissage de la seringue est l'aspiration de mucus. Ce dernier, plus épais que le sperme, va littéralement boucher l'extrémité de la seringue d'autant plus facilement si celle-ci est en verre car le diamètre est plus faible. Ce problème est en fait très vite résolu par quelques journées d'expérience.

b) Les maladies

Le sperme et le mucus à 35°C sont un excellent milieu de culture ; il nous faudra donc être très vigilants. Les germes spécifiques se trouvant sur le corps ou dans les excréments sont de loin les plus redoutables. Il faudra donc stériliser les instruments et peser toute manipulation. Il semble que deux maladies des abeilles adultes puissent être transmises par insémination artificielle :

- d'une part, la septicémie ou mélanose B ; la reine ne pond pas ou peu, puis elle devient ataxique, tombe sur le plancher et meurt.
- d'autre part, la paralysie ; les reines sont gonflées, léthargiques ; la mort survient en quelques jours.

Faute de plus amples connaissances, il semble que le meilleur moyen de lutte contre ces maladies soit la stricte observation de certaines mesures d'hygiène.

FIGURE n° 1

Chambre de l'aiguillon d'une reine préparée pour l'Insémination Artificielle
L'abdomen est comprimé, de sorte que la valvule se trouve immédiatement
au-dessous de l'entrée du vagin (Ov)

Bc - Vestibule du vagin (Bursa copulatrix) ; ESt - Entrée des poches latérales ; Hf - Repli tégumentaire ; Kh - Tube de fixation de la Reine ;
Ov - Orifice du vagin sous lequel se trouve la valvule vaginale ; S - Aiguillon ; SH - Crochet dorsal ; Sk - Fourreau de l'aiguillon ; St - Sternite ; T - Tergite ; VH - Crochet ventral.

Insémination Artificielle de la Reine d'Abeilles RUTNER 1976

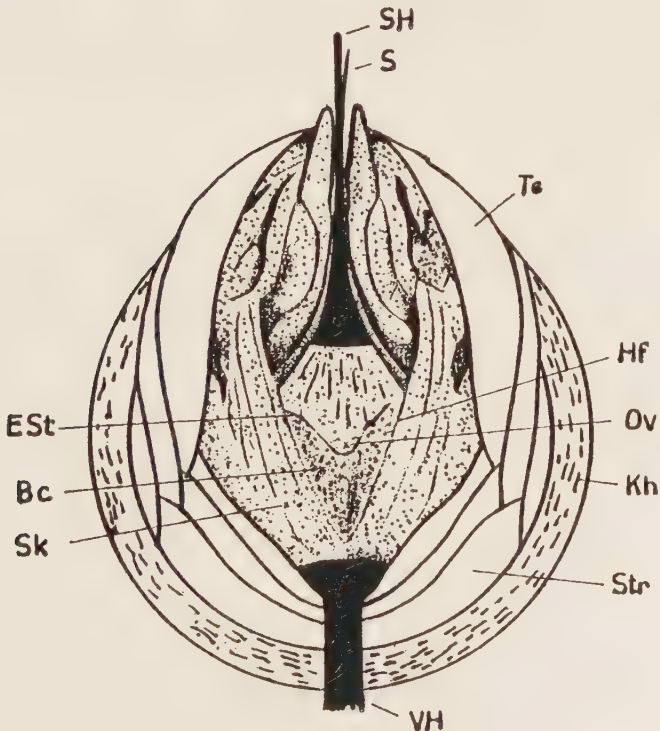


FIGURE n° 2

Abdomen d'une reine vierge

Insémination Artificielle de la Reine d'Abeilles RUTTNER 1976

Bc - Vestibule du vagin (Bursa copulatrix) ; EST - Entrée de la poche latérale ; Lo - Oviducte latéral ; Mo - Oviducte médian ; O - Ovaries ; Ov - Orifice du vagin ; R - Rectum ; S - Aiguillon ; Spt - Spermathèque ; St - Poche latérale ; Vk - Chambre vaginale ; Vp - Passage vaginal ; Vv - Valvule vaginale.

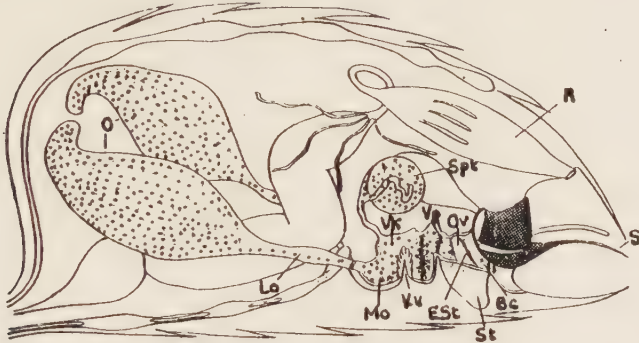


FIGURE n° 3

Organes de reproduction d'un mâle nouveau-né

Insémination Artificielle de la Reine d'Abeilles RUTTNER 1976

B - Bulbe de l'endophallus ; C - Cornules ; D.e. - Canal éjaculateur ; (Ductus ejaculatorius) ; G.m. - Glande muqueuse ; R - Rectum ; T - Testicule ; Vs - Vésicule séminale.

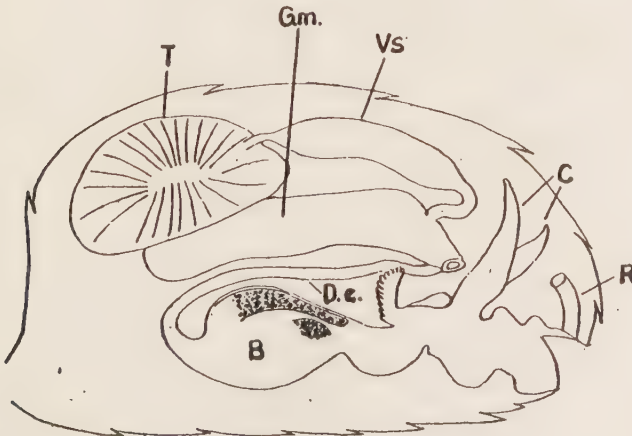


FIGURE n° 4

Endophallus retourné

En a) - jusqu'à son col (cervix) ; en b) - jusqu'aux 3/4, avec éjaculation ;
en c) - complètement.

Ae, P - Plaquette d'obturation inférieure (plaquette aedeagale) ; B - bulbe
C - Cornules ; Ce - Col (cervix) ; Ch - Plaquette chitineuse du bulbe ;
D.e. - Canal éjaculateur (Ductus ejaculatorius) ; F - Appendice élastique ;
M - Mucus ; P - Plaquette d'obturation supérieure (plaquette paramérale) ;
Sp - Sperme ; V - Vestibule.

Insémination Artificielle de la Reine d'Abeilles RUTTNER 1976

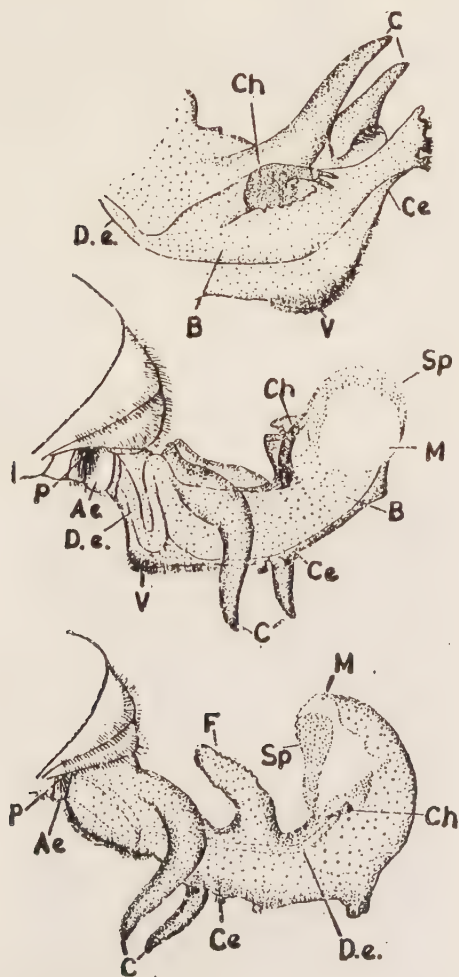


FIGURE n° 5

Seringue d'insémination selon MACKENSEN

A - Piston ; B - Corps de la seringue ; C - Tige mobile ; D - Manchon-raccord en plexiglas (socle de la pointe) ; E - Membrane de caoutchouc 6,5 x 2 ; F - Pointe en plexiglas.

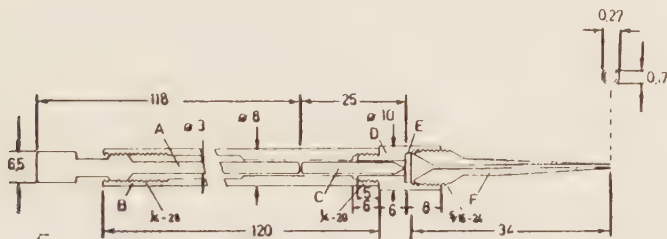
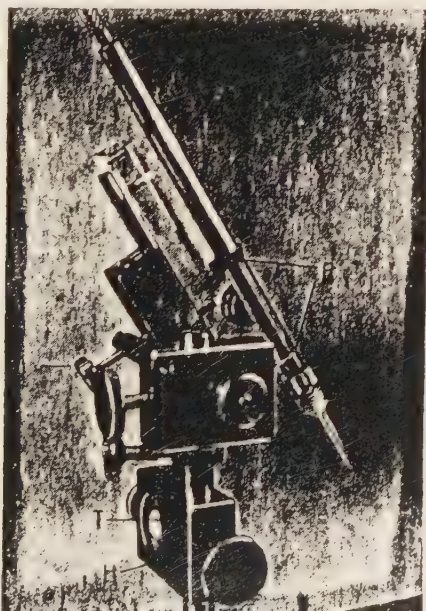


FIGURE n° 6

Bloc seringue et support pour les crochets

R - Gouttière en plexiglas pour la fixation de la seringue ; St - Vis pour le réglage de l'inclinaison de la seringue ; T - Revêtement de téflon dans le conduit du manche à crochet.



B - Examen

1°) Couleur

A l'oeil nu, le sperme apparaît comme une petite boule de couleur jaune brique plus ou moins intense. A la loupe binoculaire, le sperme laisse apparaître de longs écheveaux blanchâtres de spermatozoïdes.

2°) Numération et concentration

En apiculture, la numération revêt un intérêt moins important que dans les espèces bovine ou porcine, espèces dans lesquelles cette opération est quasiment systématique. On utilise néanmoins les mêmes techniques pour effectuer les numérations, que ce soit pour le sperme des mammifères ou que ce soit pour le sperme des insectes. Il existe plusieurs méthodes, mais nous n'en retiendrons que deux, à savoir :

- . numération par l'hématimètre
- . numération par cellule photoélectrique ou spectrophotomètre.

- Préparation de la suspension de sperme : la spermathèque et son contenu ou l'éjaculat d'un mâle dans 5 ml de solution à 0,5 MNaCl

- Lecture

a) Technique avec l'hématimètre

La concentration se fait par comptage dans un volume connu de 0,1 ml sur la grille de l'hématimètre ; en multipliant par 50.000 on obtient le nombre de spermatozoïdes par 5ml. Mais pour réduire les risques d'erreur il nous arrive de compter plusieurs grilles de l'hématimètre.

b) Technique avec le spectrophotomètre

Après plusieurs tâtonnements, il semble que la longueur d'onde optimum pour l'absorption soit 230 nm. On place quelques ml de la solution précédemment citée dans le spectrophotomètre ; il faut lire aussi rapidement que possible (le délai maximum étant de 15 mn après la préparation du sperme) car l'absorption décroît proportionnellement au temps : 5 % par heure la 1ère heure.

c) Résultats

Les mesures données par le spectrophotomètre sont beaucoup plus précises que les lectures par comptage à l'hématimètre ; le coefficient de variation est de 1 % dans le 1er cas et de 13,8 % dans le second cas.

Après de nombreux essais, il semble que les résultats des chercheurs concordent de plus en plus ; la moyenne est de 7,76 millions de spermatozoïdes par ml de sperme.

3°) Motilité - Mobilité - Action de différents facteurs

a) Motilité, Mobilité chez le mâle

La migration des spermatozoïdes des testicules vers les vésicules séminales débute 2 à 3 jours après la naissance. Ce séjour dans les vésicules séminales est nécessaire à la maturation physiologique des spermatozoïdes. Ils commencent par fixer leur tête aux cellules glandulaires de la paroi et restent au repos pendant quelques jours tandis que les cellules de la vésicule séminale libère le liquide séminal. Nous constatons une augmentation de la mobilité propre des spermatozoïdes au fur et à mesure que progresse la maturation, mais ils restent néanmoins peu mobiles dans les vésicules séminales.

b) Motilité des spermatozoïdes chez la femelle

Après l'accouplement, les spermatozoïdes migrent par chimiotactisme dans la spermathèque. Nous avons constaté une très nette différence de pH entre le liquide séminal qui a un pH de 7 et le liquide de la spermathèque oscillant entre 8,4 et 9,7 selon l'âge de la reine : à la naissance ce pH est de 8,4, à l'âge de 6 jours il est de 9,5.

De nombreux auteurs se sont appliqués à montrer qu'un pH voisin de 9 a un effet inhibiteur sur la motilité des spermatozoïdes. L'expérience suivante le montre : des spermatozoïdes placés dans un liquide de pH 9 sont très peu mobiles ; les mêmes spermatozoïdes placés dans un liquide de pH 7 retrouvent leur mobilité même après un laps de temps de 150 jours.

Pour leur part, LENSKY et SCHINDELER ont observé que les spermatozoïdes deviennent immobiles dans la spermathèque mais qu'ils recouvrent leur motilité dans un diluant.

c) Mobilité des spermatozoïdes lors d'expérimentation

Nous pouvons l'étudier sur deux plans :

. sur le plan optique

La mobilité s'apprécie au microscope après avoir dilué le sperme dans une solution appropriée ne tuant pas les spermatozoïdes. Ceux-ci sont animés de mouvements ondulatoires mais plus ou moins saccadés.

. sur le plan physiologique

Après éjaculation les spermatozoïdes sont mobiles pendant 20 mm environ, puis deviennent immobiles. On impute cette immobilité à deux causes principales :

- le manque d'oxygène

On stocke du sperme dans un tube de stockage que l'on oblitère avec soin en laissant un petit espace entre le sperme et la fermeture. Puis on ouvre le tube quelques jours plus tard, et l'on constate que pour réactiver le sperme l'oxygène ne suffit pas, mais qu'il faut ajouter une solution appropriée. L'aération des spermatozoïdes ne modifie en rien leur motilité.

- le manque de substrats utilisables

Le glucose, le tréhalose, le fructose ainsi que les phospholipides endogènes ne sont d'aucune importance dans le contrôle de la motilité. Mais il semble que d'autres facteurs stimulent les spermatozoïdes, par exemple :

- la présence de métaux lourds

Le sulfate de streptomycine augmente la capacité de fertilité dans le stockage in vitro. Outre son effet bactériostatique, la streptomycine semble jouer le rôle d'un agent chélateur, voire d'un complexe métallique. On constate que la semence traitée par la streptomycine utilise moins d'oxygène que la semence non traitée.

- les ions Na^+ et K^+

De nombreuses solutions contenant un titre approprié en Na^+ et K^+ réactivent les spermatozoïdes immobiles. La solution ci-après semble donner de bons résultats quant à la réactivation des spermatozoïdes.

Na Cl	700 mg
K Cl	25 mg
Dextrose	50 à 250 mg
Eau	100 ml

Nous pouvons résumer dans un tableau l'influence du liquide de la spermatheque et des cations sur la motilité des spermatozoïdes d'abeilles mellifères.

4°) Pourcentage de morts et de vivants

La détermination de ce pourcentage présente peu d'intérêt en pratique courante car, le plus souvent, il n'y a pas conservation du sperme, mais insémination Artificielle quasiment immédiate. Il peut être intéressant de déterminer le pourcentage lors d'une expérimentation pour déterminer par exemple la valeur de telle ou telle méthode de conservation. Nous disposons pour ce faire de plusieurs méthodes :

- le microscope à contraste de phases, méthode de loin la meilleure, la plus facile et la plus fiable
- les colorations vitales
- l'examen direct du sperme dilué peut se faire, mais le comptage des spermatozoïdes est difficile.

5°) Constitution du sperme

a) pH

Le sperme liquide de couleur crème est composé de deux éléments principaux : les spermatozoïdes et le liquide séminal. Le pH d'un sperme éjaculé est de 6,8 à 7. Le rapport entre les spermatozoïdes et le liquide séminal varie selon la saison de 1/1 à 1/2.

b) Composition

Comme les autres spermes, celui de faux bourdon contient :

- des sucres
- des acides aminés
- des enzymes
- des lipides surtout des acides gras.

. Les sucres

On note la présence dans le sperme de fructose glucose et tréhalose : il semble que ces sucres soient l'une des principales sources d'énergie pour les spermatozoïdes.

En comparant les papiers chromatographiques correspondant aux sucres du sperme et aux sucres connus standards, nous obtenons le tableau n° 3.

Le sperme fraîchement éjaculé contient environ 240 mg/100 ml de fructose mais ce taux de fructose diminue avec le temps (cf Tab 3).

Nous constatons également que la teneur en sucres des différents organes reproducteurs est différente chez le mâle avant le départ et après le retour à la ruche (Tableau n° 4).

. Les acides aminés

Nous trouvons dans le liquide séminal des Acides aminés libres et liés. Malgré quelques difficultés quant à l'importance quantitative des échantillons, nous constatons la présence de nombreux acides aminés dans le liquide séminal et dans les spermatozoïdes (Tableau n° 5).

. Deshydrogénases

Le sperme contient de nombreuses enzymes. Nous avons pu mettre en évidence la présence de l'alpha glycérophosphate NAD dépendante, lactate, de succinate de NADH2 et NADPH2 déshydrogénases.

La grande activité de l'alpha GPDH dans les spermatozoïdes permet de fournir une quantité de glycérol rapidement disponible, substrat qui peut être oxydé dans les spermathèques.

La grande concentration en lactate déshydrogénase tend à prouver que l'acide lactique est l'aboutissant normal de l'oxydation des hexoses présents dans le contexte séminal. D'autres enzymes sont également très actives, par exemple, la succinate déshydrogénase (SDH) et la NADH2 jouent un rôle important dans le métabolisme oxydatif de la chaîne respiratoire.

. Les lipides

Les spermatozoïdes d'abeilles oxydent rapidement les sucres libres se trouvant dans le liquide séminal, si bien que 30 à 40 mm après éjaculation, le fructose voit sa concentration réduite de 80 %. Mais nous avons observé que, sous certaines conditions d'aérobiose, les spermatozoïdes sont très motiles 3 heures après éjaculation ; il est fort probable que l'énergie nécessaire provient de l'oxydation des acides gras ou des phospholipides. Le tableau n° 6 suivant résume la composition du sperme en lipides. Il est cependant intéressant de noter que, contrairement aux autres spermes d'invertébrés, le sperme d'abeille ressemble à celui des mammifères, d'une part par la composition en lipides, d'autre part par le fait que les spermatozoïdes oxydent les composés glucidiques.

En résumé, nous pouvons dire que chronologiquement, les spermatozoïdes utilisent les glucides, puis les acides gras à courtes chaînes et enfin les phospholipides après hydrolyse.

TABLEAU n° 3

(22) S. TABER III 1977

Composé	Rf valeur	Couleur + diphenylalanine	Temps de dévt en minutes
Tréhalose	0,05	gris clair	36,0
Sucre A	0,05	gris clair	36,0
Glucose	0,15	gris	17,0
Sucre B	0,15	gris	17,0
Fructose	0,21	marron	20,0
Sucre C	0,21	marron	20,5

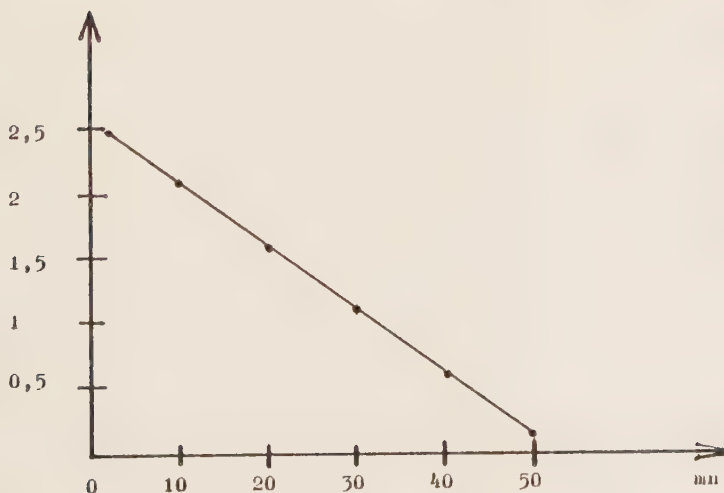


TABLEAU n° 4

(22) S. TABER 1977

Organes	Sucres en microg / mg tissu					
	Départ			Retour		
	F	G	T	F	G	T
Testicules	6,69	7,48	2,84	0,28	0,21	0,42
Vésicules séminales	1,22	0,67	0,26	0,09	0,06	0,13
Gl. à mucus	0,72	1,09	0,34	0,06	0,05	0,07
Bulbe	3,21	3,02	0,51	0,02	0,09	0,18

TABLEAU n° 5

(22) S. TABER 1977

	Liquide séminal		Sperme
	Libre	Lié	Lié
Tyrosine	0,37	0,46	8,20
Méthionine	0,28	0,32	4,70
Leucine	0,46	0,57	12,50
Cystine	0,38	0,44	7,80
Isoleucine	0,42	0,51	5,90
Tryptophane	0,31	0,48	4,10
Lysine	0,73	0,92	12,60
Phénylalanine	0,44	0,60	9,30
Arginine	1,20	1,37	39,20
Acide glutamique	0,87	1,03	10,40
Glycine	0,19	0,38	6,40
Alanine	0,20	0,44	7,10
Acide aspartique	0,23	0,37	6,70
Sérine	0,32	0,41	5,80
Treonine	0,11	0,26	3,79

TABLEAU n° 6

BLUM 1967

Composition du sperme de faux bourdons en lipides

Composition relative

Longueur des chaînes carbonées	Phospholipides	Acides gras libres	Tryglycérides	Esters de Stérol
6:0	0.4	-	1.4	-
7:0	-	-	3.5	-
8:1	0.8	2.9	-	-
10:0	0.4	4.6	1.0	-
11:0	0.6	5.7	1.0	-
12:0	0.4	4.9	0.9	Trace
12:1	0.2	0.6	Trace	Trace
13:0	0.3	0.9	-	Trace
13:1	-	1.7	Trace	-
14:0	0.1	2.9	2.6	2.2
14:1	0.4	3.4	1.6	2.2
14:U	-	-	-	0.5
15:0	0.3	3.1	1.6	1.5
15:1	-	1.4	Trace	2.1
16:0	23.5	9.7	22.4	19.3
16:1	0.1	13.7	9.1	14.0
17:0	-	-	0.3	1.9
17:1	1.9	-	Trace	0.5
17:U	-	-	-	1.0
18:0	3.8	13.4	6.4	13.1
18:1	56.3	17.4	18.5	15.0
18:2	1.2	4.3	22.7	3.6
18:3	1.1	2.6	3.0	1.7
20:0	3.1	2.9	-	6.5
20:4	4.8	-	0.6	0.3
20-22:U	0.2	0.9	0.8	2.1
20-22:U	-	0.9	0.8	11.9
20-22:U	-	2.0	0.6	-

c) Structure des spermatozoïdes

. Introduction

La structure des spermatozoïdes de Vertébrés et d'Invertébrés a été intensément étudiée durant ces dernières années et ces travaux ont montré que la morphologie externe peut varier largement, leur structure de base restant la même. Les spermatozoïdes d'insectes ont été étudiés par de nombreux auteurs. Généralement, ils n'ont pas de pièce centrale mais une très grande queue constituée par le flagelle et les dérivés des mitochondries (Maria Alice Da Cruz Höfling & Col.).

. Méthode et matériel

Les spermatozoïdes sont collectés à partir des canaux déférents de pupes prêtes à éclore, de vésicules séminales de mâles adultes ou de la spermathèque d'une reine fertile. Après avoir été mis à nu, ces organes sont examinés, soit directement au microscope optique fluorescent, soit au microscope électronique après fixation au Os O₄ à 1% et section à l'ultramicrotome.

. Résultats

- Microscope optique

Les spermatozoïdes apparaissent comme des cellules minces très allongées de 250 microns sur 0,7 microns. Excepté les deux extrémités, le diamètre est constant sur toute la longueur de la cellule. Anatomiquement seules la tête et la queue peuvent être reconnues. La tête a environ 10 microns de long.

- Microscope électronique

■ Morphologie générale

La morphologie externe et interne des spermatozoïdes obtenues de différents organes du mâle ou de la femelle est identique à celle obtenue au microscope optique. On a pu néanmoins relever quelques détails : avec la coloration négative toutes les préparations de spermatozoïdes révèlent un acrosome lancéolé, un noyau en baguette et une très longue pièce intermédiaire. Les deux dérivés des mitochondries s'étendent sur 200 microns.

Les spermatozoïdes présentant des dérivés mitochondriaux étroitement liés au flagelle représentent un type évolué. Etant donné la différence de taille des dérivés mitochondriaux et leur disposition asymétrique, on parle, pour simplifier, de partie antérieure pour l'acrosome, de partie postérieure pour la queue, de côté dorsal pour le côté présentant les dérivés mitochondriaux et de côté ventral pour la partie contenant le flagelle.

Dans les organes qui les contiennent, les spermatozoïdes apparaissent en paquet : les têtes enfoncées dans les microvillosités de l'épithélium sont perpendiculaires à la paroi et les queues, dans la lumière, sont incurvées dans la région moyenne.

* Acrosome

Dans toutes les préparations de spermatozoïdes, l'acrosome apparaît comme une proéminence lancéolée aplatie dorsoventralement et incurvée vers la face dorsale. Il a 40 à 45 microns de long, 0,2 microns d'épaisseur et 0,6 microns de large, il est moins dense que le noyau. Le filament acrosomal est plus dense que le reste de l'acrosome, et se termine brusquement avant la fin de ce dernier. A l'extrémité postérieure le filament acrosomal pénètre dans le noyau.

Par sections longitudinales de spermatozoïdes, on observe très rarement une pointe aciculaire à la portion antérieure de l'acrosome. Il est probable que cette structure est très délicate et qu'elle ne peut supporter le processus de préparation. Le filament acrosomal est enveloppé par une membrane et un espace apparaît entre le filament et la membrane de l'acrosome. Dans cet espace on voit souvent un corpuscule dense. Dans la portion antérieure de l'acrosome ces corpuscules se montrent plus larges et directement attachés au filament lequel acquiert dans ces portions une forme cylindrique. Dans une région encore plus antérieure le filament acrosomal disparaît et les corps denses fusionnent. A la partie proximale le filament acrosomal devient aussi cylindrique et les corpuscules denses ne se voient pas. Ces derniers pourraient correspondre à une structure en anneau décrite par ROTHSCILD à deux microns en dessous de la pointe de l'acrosome. Cette partie supérieure de l'acrosome peut être l'équivalent de la capsule nucléaire de YASAZUNI depuis la mise en évidence que les deux structures proviennent du Golgi. Cette partie supérieure pourrait représenter l'acrosome fonctionnel.

* Noyau

Bien qu'ayant le même diamètre que l'acrosome, le noyau semble plus long et moins aplati. Les dimensions moyennes sont 5,5 x 0,6 x 0,3 μ .

Dans la portion antérieure, le noyau forme un sillon près du 5ème du noyau où le filament acrosomal s'adapte. Une telle disposition est présente dans des sections perpendiculaires à la connection noyau acro-

some. Le filament acrosomal forme une structure ressemblant à un globule dans la région postérieure de cette jonction. La chromatine nucléaire est très dense. Après coloration à l'uranyl acétique, le noyau est facilement différencié de l'acrosome par sa grande densité électronique.

A la partie postérieure on peut voir des sillons sur le noyau, sillons dans lesquels se fixent la flagelle et les dérivés mitochondriaux.

Dans la région dorsale, le noyau fait une proéminence ressemblant à un doigt dans le complexe axial du flagelle, ainsi les fibrilles du flagelle sont figées dans sa portion basale.

Dans la région ventrale, il y a deux dépressions dans lesquelles sont fixés les deux dérivés mitochondriaux, le plus petit commence avant le plus large.

* Queue

Le flagelle commence plus en avant que les dérivés mitochondriaux et il est quelque peu orienté par rapport au grand axe de spermatozoïdes. Par sections transversales, les microfibrilles apparaissent d'abord dorsalement et, seulement dans la région postérieure, ils forment un anneau complet autour de la proéminence nucléaire. Dans la zone centriole les microfibrilles ne sont pas individualisées et il est alors difficile de les compter. Il semble cependant qu'il y ait neuf fibrilles larges et plusieurs plus courtes, disséminées parmi celles-ci. Les dérivés des mitochondries sont séparés du noyau par une discontinuité oblique représentée par l'enveloppe nucléaire et la membrane mitochondriale. A la coloration négative on voit des cristaux se présentant comme des formations enroulées à la surface des mitochondries. Dans la mitochondrie gauche l'hélice est lévogyre, tandis qu'à droite elle est dextrogyre. Le dérivé mitochondrial gauche est plus grêle que le droit. Les cristaux dans les dérivés des mitochondries ont 250 Å de large et 100 Å d'épaisseur. Ils sont séparés de 50 Å les uns des autres et sont inclinés à 30° par rapport à l'axe principal du spermatozoïde.

Les dérivés mitochondriaux sont séparés du complexe axial par deux structures deltoïdes. L'ensemble du complexe axial, les dérivés mitochondriaux et les structures deltoïdes sont entourés par la membrane plasmatique.

Par sections judicieuses du complexe axial, on voit que les deux fibrilles centrales sont liées par deux connections circulaires. Les microfibrilles ont un diamètre de 180 Å, sont séparées l'une de l'autre par un espace de 125 Å et sont apparemment solidaires. Ces microfibrilles centrales sont entourées par neuf éléments en croissant de lune dont la convexité est tournée à l'extérieur. Ils sont liés radialement aux doublets périphériques par des rayons. A la fin des dérivés mitochondriaux la queue du spermatozoïde est très courte, 10 microns. Ce qui caractérise le complexe axial, c'est qu'il perd progressivement ses fibrilles, mais il n'est plus possible de savoir quelles sont les fibrilles disparaissant les premières.

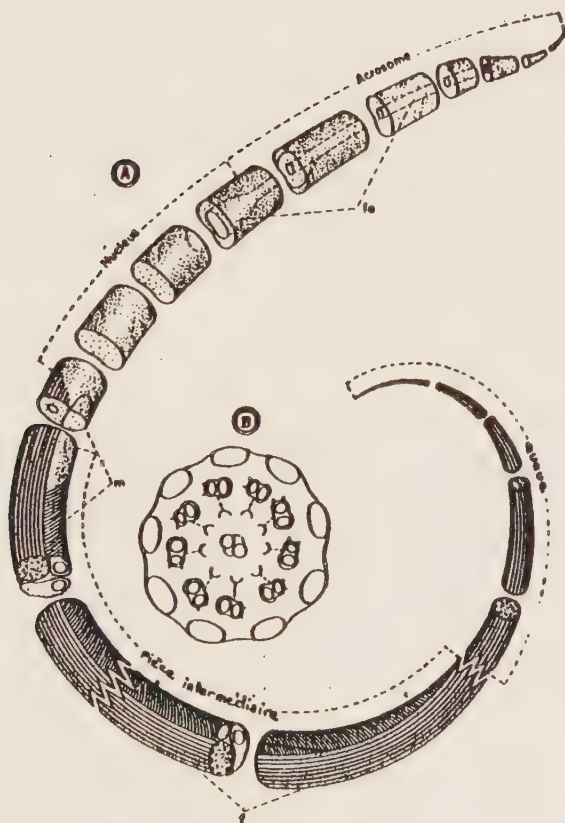
FIGURE n° 7

Spermatozoïde de faux-bourdon

A - Structure

B - Coupe transversale
de la queue

fa : filament acrosomal ; m : dérivés mitochondriaux ; f : flagelle



d) Métabolisme

De nombreux auteurs ont tenté d'expliquer la longévité inhabituelle des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque par des facteurs biochimiques. Actuellement, malgré les puissants moyens mis en oeuvre par certains pays (VERMA), ce caractère extraordinaire du sperme pose encore bien des problèmes.

. Coefficient respiratoire du sperme d'abeille

Le coefficient respiratoire du sperme fraîchement éjaculé par un mâle a été déterminé au moyen d'un respiromètre cartésien avec sonde. C'est un appareil admirable pour l'analyse de la petite quantité de sperme qu'on récolte d'un mâle. Le coefficient respiratoire moyen du sperme dilué a été de 0,64 h indiquant que les phospholipides pourraient constituer la principale source d'énergie. BLUM & Col. (1962) ont constaté que les spermatozoïdes d'abeilles mellifères oxydent rapidement les sucres libres se trouvant dans le plasma séminal, de sorte que 40 mn après éjaculation la concentration de fructose est diminuée de 80 %. Ils ont également communiqué (1967) que les phospholipides prédominent dans le sperme d'abeille mellifère, se trouvant surtout dans les masses denses de spermatozoïdes et que leur concentration baisse pendant leur incubation aérobie. Il nous semble donc (VERMA) que les phospholipides sont la principale source d'énergie.

. Motilité et métabolisme du sperme pendant le stockage in vitro

Pendant le stockage in vitro du sperme, non dilué, les spermatozoïdes se trouvent dans une immobilité réversible. Ils deviennent inactifs à la suite d'une période de motilité de 20 à 25 mn après éjaculation. L'absence de la motilité du sperme a été associée à une diminution remarquable de la vitesse métabolique pendant la conservation in vitro car le sperme stocké à 13-14° C pendant un mois d'après la méthode de POOLE & TADDER (1970) manifeste une consommation d'oxygène voisine de 40 %, de celle du sperme fraîchement éjaculé. On suppose que l'activité doit être très basse dans un stade inactif. Une telle activité métabolique basse peut être essentielle pour les spermatozoïdes qui doivent résister à l'effet du vieillissement physiologique pendant leur stockage prolongé dans la spermathèque.

. La densité des spermatozoïdes de la spermathèque et l'effet de la dilution

L'absence de mouvement des spermatozoïdes dans le sperme non dilué d'oursin a fait l'objet d'une théorie émise par GREY (1931) et selon laquelle les spermatozoïdes ne peuvent se mouvoir lorsqu'ils sont agglomérés, car chaque

cellule a un rôle restrictif ou allélostatique sur l'activité des autres cellules. Cette théorie est applicable aux spermatozoïdes car ils manifestent une faible activité métabolique constituant un dispositif pour économiser l'énergie.

. Effet des cations sur la respiration des spermatozoïdes

Notre étude porte sur les ions Ca^{++} Na^+ K^+ Mg^{++} . Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau n° 8 Ci-après.

On constate que la Na^+ seul ou le K^+ seul à la concentration dans laquelle ils se trouvent dans la spermathèque n'inhibe pas la motilité des spermatozoïdes. Pourtant si l'on emploie soit le Na^+ à une concentration égale à la concentration totale du Na^+ et K^+ de la spermathèque, soit le K^+ à cette même concentration, l'inhibition réversible de la motilité apparaît.

Le Na^+ et le K^+ semblent agir par le maintien d'une concentration osmotique dans la spermathèque. Le mécanisme serait d'ordre physique plutôt que physicochimique.

6°) Qualité bactériologiques du sperme

De nos jours, en France, le sperme ne fait l'objet d'aucun contrôle bactériologique. Nous sommes très loin des examens approfondis dont font l'objet les spermes de taureaux dans les centres d'insémination artificielle. Il est néanmoins nécessaire de rappeler que :

- le matériel d'insémination doit être stérilisé
- tout sperme ayant été en contact de près ou de loin avec des matières fécales doit être rejeté de façon nette et définitive
- le travail doit se dérouler dans une pièce claire, très propre et bien éclairée, sans quoi nous nous exposons à des pertes très importantes de reines.

TABLEAU n° 7

Influence de la dilution et du stockage sur la consommation d'oxygène
du sperme d'abeille mellifère

Apimondia MOSCOU 1976

Variantes	Nombre d'échantillons	Consommation d'oxygène ml O ₂ /10 ⁶ spermatozoïdes/heure 20,4°
A. Sperme fraîchement éjaculé; témoin	7	2,46 ± 0,13
B. Sperme + sulfate de streptomycine pulvérisé au fond du bulbe de la sonde	7	2,01 ± 0,11
C. Sperme stocké	7	0,80 ± 0,08
D. Sperme dilué	7	3,61 ± 0,15
Significations statistiques		A B (P 0,05) A C (P 0,01) D A et B (P 0,01)

TABLEAU n° 8

Influence des cations sur la motilité des spermatozoïdes
d'abeille mellifère

Apimondia MOSCOU 1976

Variantes	Concentrations osmotiques totales « milliosmoles/ml	Motilité après la dilution	Réactivation au tampon iris
Dissolvant contenant du Na ⁺ dans une quantité égale à celle de l'homogénéat de spermathèque	499	+	—
Dissolvant au K ⁺ dans une quantité égale à celle de l'homogénéat de spermathèque	594	+	—
Dissolvant au Na ⁺ = Na ⁺ + K ⁺ dans une quantité égale à celle de l'homogénéat de spermathèque	639	—	—
Dissolvant au K ⁺ = Na ⁺ + K ⁺ dans une quantité égale à celle de l'homogénéat de spermathèque	639	—	+
Dissolvant au Na ⁺ + K ⁺ + sucres dans une quantité égale à celle de l'homogénéat de spermathèque	866	—	+
Sperme dilué 5 fois avec dissolvant contenant du Na ⁺ + K ⁺ dans une quantité égale à celle de l'homogénéat de spermathèque	1064	—	+

C - Conservation

Nous envisagerons tout d'abord la conservation du sperme dans la spermathèque, sujet de différentes théories, puis la conservation dite "artificielle" qui est actuellement à l'origine de nombreuses contre-verses.

1°) Dans la spermathèque

Les spermatozoïdes sont remarquables par leur longévité dans la spermathèque. Le stockage dans cette dernière pendant 7 ou 8 ans n'affecte aucunement la fertilité des spermatozoïdes. Avant d'aborder ce sujet, il nous semble nécessaire de faire quelques rappels concernant le sperme et la spermathèque.

a) Composition du sperme

Le pH du sperme oscille entre 6,8 et 7,1 selon les méthodes de mesure. L'analyse biochimique nous révèle la présence de fructose, glucose et tréhalose. Les testicules semblent être la principale source de ces sucres, que nous retrouvons dans l'hémolymphe. Ils ne semblent pas jouer de rôle lors de stockage dans la spermathèque. Le liquide séminal contient environ 0,67 % de protéines. L'arginine représente près de 40 % des acides aminés libres ou liés. Le liquide séminal renferme également beaucoup de lysine et glutamine. L'arginine et lysine sont probablement sous forme de désoxyribonucléoprotéines. Les phospholipides représentent la plus grande source d'énergie pour la respiration endogène. L'énergie est fournie par le cycle de Krebs et la glycolyse. Après une analyse fine, il semble que la glycérophosphate oxydase joue un rôle primordial dans le stockage prolongé dans la spermathèque.

b) Structure et biochimie de la spermathèque

C'est une sphère de 0,95 à 1,3 mm de diamètre ayant un volume de 0,8 à 1,5 micro l et entourée par deux réseaux de trachées. KOENIGER montre qu'après l'ablation de la trachée entourant la spermathèque une reine fécondée devient boudonneuse, donc les spermatozoïdes sont non fonctionnels ou morts. D'après de récentes études de la paroi au microscope électronique, les cellules épithéliales subissent une modification morphologique : la reine subit donc une maturation et une différenciation avant de devenir reproductrice.

Une glande spermatique bifide est disposée à la face dorsale de la spermathèque : après ablation des deux branches, les spermatozoïdes ne pénètrent dans la spermathèque que dans une proportion de 1 à 2 %.

c) Liquide de la spermathèque

Ce liquide dont le pH est voisin de 9, contient du fructose, du glucose du tréhalose à une concentration plus basse que dans l'hémolymphe. Après analyse des protéines de la spermathèque, nous pouvons affirmer qu'elle représente un compartiment liquidien séparé de l'hémocele pour ce qui concerne le trafic macromoléculaire. Une protéine spécifique a été détectée dans l'hémolymphe de la reine ; sa synthèse est sous la dépendance de l'hormone des corps allates.

d) Motilité et métabolisme du sperme dans la spermathèque

Nous ferons quelques allusions au stockage in vitro, car il est très difficile d'apprécier l'état des spermatozoïdes dans la spermathèque. Il est bien établi que les spermatozoïdes peuvent survivre pendant plusieurs années dans la spermathèque, mais la question est de savoir si les spermatozoïdes stockés sont mobiles ou immobiles. De nombreuses opinions contradictoires ont été émises, mais il nous semble que les hypothèses de FLANDERS (1939) d'une part, et de VERMA d'autre part, peuvent être retenues :

- pour l'un, les spermatozoïdes sont immobiles, mais ils peuvent être activés par des sécrétions de la glande spermatique.
- pour l'autre, le liquide d'une spermathèque privée de ses glandes inhibe la motilité, mais ceci de façon réversible. Au contraire, le liquide d'une spermathèque intacte n'inhibe pas la motilité des spermatozoïdes.

L'activité métabolique des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque n'a pas été mesurée. Les spermatozoïdes sont immobiles, ceci de façon réversible, pendant leur conservation in vitro durant un mois à 13-14° C. Ils deviennent inactifs 25 mn après l'éjaculation. L'absence de motilité du sperme est associée à un niveau métabolique très bas pendant le stockage in vitro et ceci peut être essentiel pour éviter un vieillissement physiologique des spermatozoïdes lors d'un stockage prolongé. Une question se pose : quels sont les facteurs responsables, dans l'environnement des spermatozoïdes, du contrôle de la motilité et du métabolisme de ceux-ci dans la spermathèque ou lors du stockage in vitro de sperme non dilué ? Pour essayer de clarifier ce problème, il nous faudra prendre en considération quelques-uns des nombreux facteurs responsables de cet état.

. Le manque d'oxygène

Tous les spermatozoïdes d'un éjaculat frais deviennent immobiles après une activité de 20 à 25 mn. Si le manque d'oxygène était directement impliqué, quelques spermatozoïdes de la périphérie devraient être motiles. Des observations ont été faites lors d'expériences dans lesquelles la spermathèque

d'une reine inséminée est écrasée : les spermatozoïdes restent immobiles, ils redeviennent mobiles lors de l'adjonction d'un diluant. La paroi de la spermathèque est entourée d'un dense réseau de trachées : les échanges gazeux à travers celle-ci prouvent qu'il n'y a aucune déficience d'oxygène pour les spermatozoïdes stockés. La déficience d'oxygène n'est donc pas responsable de l'inactivation des spermatozoïdes aussi bien dans la spermathèque qu'in vitro.

. Le manque de substrat utilisable

Le glucose, le tréhalose, les phospholipides endogènes, les composés glycolysables exogènes n'ont aucune importance dans le contrôle de la motilité.

. Le gaz carbonique et le pH

Selon FLANDERS, le gaz carbonique, résultant de la respiration, immobiliserait les spermatozoïdes dans la spermathèque. En fait, le liquide et la glande de la spermathèque ont un pH respectivement de 9 et 7. La concentration en CO₂ n'est pas responsable de l'immobilité des spermatozoïdes dans la spermathèque.

. La présence de métaux lourds

Le sulfate de streptomycine augmente la capacité de fertilité dans le stockage in vitro. Cet antibiotique joue le rôle d'un complexe métallique et d'un agent chélateur. La semence ainsi traitée consomme moins d'oxygène. Les spermatozoïdes non mobiles ne sont pas activés par l'addition de streptomycine.

. Densité du sperme et effets de dilution

Nous comptons entre 7,46 et 7,76 millions de spermatozoïdes par microlitre de sperme. Dans la spermathèque ils apparaissent groupés en amas, ce qui explique la réduction de leur activité métabolique. Cette économie d'énergie permet aux spermatozoïdes de vivre et de garder leur fertilité longtemps, aussi bien dans la spermathèque que lors du stockage in vitro.

. Les concentrations en Na⁺ et K⁺

Les concentrations ioniques dans la spermathèque sont importantes dans la

suppression de la motilité, le métabolisme et dans la survivance des spermatozoïdes à long terme. Selon VERMA, les concentrations en Na^+ et K^+ dans la spermathèque sont plus importantes que dans tous les autres tissus ou liquides de la reine. L'inactivation des spermatozoïdes dans la spermathèque peut être induite par la forte concentration en Na^+ et K^+ ; nous pouvons, de la même façon, expliquer leur réactivation lors de la sortie de la spermathèque par le simple fait de la diminution de la concentration en Na^+ et en K^+ . Nous pouvons artificiellement inactiver les spermatozoïdes par du liquide de la spermathèque ou par un liquide artificiel dont la concentration en Na^+ et K^+ est voisine de celle de la spermathèque ; dans les deux cas la consommation en oxygène est maintenue à un niveau voisin de celui du sperme frais.

Le rapport entre les concentrations en Na^+ et en K^+ n'apparaît pas important. Les fortes concentrations semblent agir dans la spermathèque par la forte pression osmotique qu'elles maintiennent. Il est très difficile de mesurer directement la pression osmotique du liquide de la spermathèque mais la valeur calculée est voisine de celle trouvée pour le plasma ou l'hémolymphe. Il semble donc que cet environnement hypertonique dans la spermathèque empêcherait la perte de matériel intracellulaire provenant des spermatozoïdes stockés. Un tel mécanisme paraît plus physique que physiologique ou biochimique.

2°) Artificielle

Nous pouvons considérer qu'il existe deux méthodes artificielles de conservation du sperme :

- l'une à température ambiante
- l'autre par congélation basse dans l'azote liquide.

Cette dernière méthode ne peut être utilisée que par un laboratoire bien équipé ou par un groupement d'apiculteurs avertis.

a) 1ère méthode

. sans solvant

Elle a fait l'objet de nombreuses recherches dont l'un des principaux objets a été de permettre aux apiculteurs spécialisés dans la sélection de l'abeille, de continuer leur travail durant les saisons pendant lesquelles les mâles ne sont pas disponibles. La possibilité de stocker la semence in vitro pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, réduit cette restriction saisonnière. D'une façon générale il apparaît plus aisé de conserver du sperme qu'un grand nombre de colonies.

TABER et BLUN ont été les premiers à montrer que la semence d'abeilles peut être stockée *in vitro* et qu'elle peut maintenir sa capacité fertilisante.

- Matériels méthodes

La semence est collectée, traitée, stockée dans des tubes en verre scellés et récupérée plus tard pour l'insémination artificielle selon les procédés décrits par POOLE et TABER. Les donneurs de sperme sont des mâles de caractère dominant "type sauvage", toutes les femelles vierges de 1 ou 2 semaines sont récessives "cordovan". Nous démontrons ainsi de façon sûre que les reines donnant des descendants de "type sauvage" ont été inséminées avec de la semence hautement fertile.

Le sperme est scellé dans des tubes de verre contenant du sulfate de streptomycine ou de l'éthylène diamine tétra-acétique (E.D.T.A.) ou les deux. Nous avons également préparé des tubes de contrôle ne contenant que de la semence sans additif. La moitié d'entre eux ayant subi un traitement est stockée au réfrigérateur à 13 - 15° C le reste est laissé à température ambiante à 24° C. Après 13, 17, 21 et 35 semaines de stockage le sperme provenant de chaque groupe de traitement et de chaque température est utilisé pour des inséminations artificielles. Chaque reine reçoit 3 à 5 micro l de sperme. Le succès de la méthode est indirectement mesuré par la production d'une descendance d'ouvrières de "type sauvage". Les ouvrières "cornovan" d'origine parthénogénétique quant à elles mesurent plus ou moins le degré d'échec de la méthode.

Tous les essais de stockage ne sont pas couronnés de succès et nombreux sont les exemples pouvant en témoigner. Il existe de nombreuses altérations du sperme ; par exemple les tubes présentent une odeur de putréfaction, mais aucune bactérie n'a pu être isolée ; en fait cette odeur est due au rancissement se développant au sein des lipides du sperme lors du stockage.

D'autres additifs ont été utilisés, la Pénicilline G comme antibiotique, l'hydroxybutyrate de toluène et le propylgallate comme antioxydants, mais ils se sont révélés très peu efficaces dans la préservation de la capacité fertilisante du sperme.

- Résultats

La capacité fertilisante du sperme traité à la streptomycine et maintenu à 13-15° C reste forte pendant 35 semaines de stockage. C'est le meilleur résultat que l'on

ait pu obtenir jusqu'à ce jour. De la semence non traitée mais maintenue à 13-15° C maintient sa capacité de fertilité pendant un temps de stockage de 17 semaines environ, car nous avons pu inséminer une reine qui a donné des descendantes ouvrières avec du sperme stocké pendant 21 semaines.

Dans les tubes correspondants au traitement à l'E.D.T.A. ou sulfate de streptomycine plus E.D.T.A., la semence se coagule et se putréfie.

La mortalité est éminemment haute pour les reines inséminées avec du sperme conservé 21 semaines à 13-15° C.

- Discussion

La préservation de la capacité de fertilisation pour la semence stockée in vitro pendant 35 semaines représente une augmentation substantielle par rapport aux quelques 15 semaines de stockage antérieurement rapportées. Cette prolongation réelle à la température de 13-15° C laissera un espoir de pouvoir accomplir des stockages fructueux plus longs à des températures voisines de 0° C. La coagulation et la putréfaction du sperme stocké plus de 17 semaines à température ambiante sont imputables à la contamination du sperme par de l'hémolymphe, du mucus vaginal ou des matières fécales, ce qui est plus rare. Le fait que rien ne se produise à 13-15° C met en valeur l'effet bénéfique des températures modérées.

. avec solvant à 10° C

Pour certains auteurs il apparaît nécessaire d'utiliser un bon diluant pour le sperme. On a testé de nombreux milieux, comme les solutions de RINGER et LOCKE, la solution de JAYCOX, en les faisant agir directement sur les spermatozoïdes. Une récente étude a conduit les chercheurs du Brésil à utiliser l'eau de noix de coco comme diluant. Cette dernière après avoir été autoclavée est stabilisée à un pH voisin de 7 à l'aide d'une solution de soude à 10 %. La dihydrostreptomycine est néanmoins indispensable, car ces diluants sont très facilement contaminés par les bactéries.

Pour tester l'utilisation de ces solutions, des reines furent inséminées avec 2mm³ de sperme dilués dans 2 micro l d'eau de noix de coco. Les reines sont disséquées tous les jours à partir de 48 heures temps jugé nécessaire à la migration des spermatozoïdes dans la spermathèque. La solution, 10 ml d'eau de noix de coco et 10 mg de streptomycine donne les résultats les plus satisfaisants : la viabilité des spermatozoïdes est de 100 % au 11ème jour et de 0 % au 16ème jour, la température de conservation étant voisine de 10° C. Aucune infection secondaire des reines n'a été constatée à ce jour.

Cette technique de conservation semble moins concluante que la précédente. Outre son intérêt dogmatique non négligeable, ce diluant du sperme offre deux inconvénients majeurs :

- d'une part, la nécessité d'inséminer un double volume pour le même nombre de spermatozoïdes d'où les conséquences sur la spermathèque
- d'autre part, le faible temps de conservation des facultés du sperme.

L'eau de coco pourra néanmoins être utilisée dans les seringues à insémination en remplacement de l'eau pure.

b) 2ème méthode

Nous venons de montrer que placer du sperme de faux bourdons à température ambiante est un moyen relativement efficace de conservation. En assurant la stérilité et en ajoutant des antibiotiques au liquide spermatique nous pouvons conserver à la température ambiante du sperme viable pendant des périodes de 70 à 110 jours. Conservé dans de telles conditions, le sperme ne peut être utilisé que pour l'insémination d'une seule génération de reines. De plus, le sperme, bien que traité avec des antibiotiques, est contaminé par différents germes ; par conséquent il n'est plus aussi efficace pour l'insémination artificielle des reines. Il semble donc nécessaire de trouver une méthode qui permettrait d'une part de conserver le sperme pendant plusieurs mois, d'autre part d'écarter les risques de pollution bactérienne.

Cette méthode idéale est représentée par la congélation basse dans l'azote liquide : elle est utilisée de façon courante pour la conservation du sperme dans l'espèce humaine chez les Bovins et chez les caprins. Pour ce qui est du sperme de faux bourdons, elle présente les mêmes intérêts, mais son utilisation est très controversée selon que l'on s'adresse aux chercheurs russes ou américains.

. Point de vue des chercheurs américains

- Protection du sperme et des spermatozoïdes

Très tôt est apparue la nécessité de protéger le sperme contre l'agression que représente le passage de la température ambiante à la température de l'azote liquide. Plusieurs protecteurs ont été proposés et testés ; les seuls qui soient retenus actuellement sont le diméthylsulfoxyde ou DMSO et le glycérol. Les proportions jugées adéquates sont 60 % de sperme, 30 % d'une solution saline, 10 % DMSO. Cette substance a été utilisée avec succès par BROWN en 1971 comme protecteur de froid pour des cellules de *Drosophile* stockées dans l'azote liquide. Avant de pouvoir utiliser le DMSO comme protecteur, il semble nécessaire de tester la capacité des reines à tolérer des inséminations contenant ce produit. L'adjonction du mélange DMSO et solution saline ne réduit pas le transport de sperme dans

la spermathèque et les descendants obtenus sont normaux. Les spermatozoïdes sont mobiles après stockage dans l'azote liquide et toutes les reines inséminées avec ce sperme congelé le retiennent dans la spermathèque. Mais le nombre de spermatozoïdes retenu dans la spermathèque est beaucoup moins important qu'avec du sperme non congelé.

John HARBO a réalisé un protocole d'expérimentation pour prouver si oui ou non le DMSO est responsable de la survivance du sperme et pour mesurer l'effet du stockage (dans l'azote liquide) sur le transport intérieur du sperme dans la spermathèque de la reine.

Il établit 4 groupes test A B C D. Les groupes A et D reçoivent des tubes contenant 60 % de sperme 30 % de solution saline et 10 % de DMSO. On mélange précédemment le DMSO et la solution saline car cette réaction exothermique dénature les spermatozoïdes. Les groupes C et D reçoivent des tubes contenant 60 % de semence et 40 % de solution saline. Nous constatons que le stockage dans l'azote liquide réduit le nombre de spermatozoïdes atteignant la spermathèque. Sans DMSO comme protecteur de froid, le sperme ne survit pas. La présence des spermatozoïdes dans la spermathèque ne peut être considérée comme une mesure directe de succès, mais leur absence est un échec car le transport de sperme dans la spermathèque est un pas intermédiaire important dans la fertilisation des oeufs. Le DMSO permet aux spermatozoïdes de supporter la rude transition que sont les passages de la température ambiante au froid intense, et réciproquement.

. Tolérance du sperme au froid intense

Les auteurs SAWADA et CHANG ont étudié le comportement du sperme sous des présentations différentes, à savoir : le sperme non dilué, le sperme dans les vésicules séminales, le sperme dans la spermathèque. La semence est chaque fois additionnée de 7 à 10 % de glycérol. On place chaque échantillon dans un tube plastique que l'on soumet à congélation basse. Après plusieurs jours, on dégèle les échantillons en les plaçant à 24-25° C. On examine les prélèvements et on apprécie la motilité des spermatozoïdes à 35° C. Les résultats sont placés dans le tableau n° 9.

Nous pouvons constater que :

- la dilution du sperme avec la solution de LOCKE (7 % glycérol) semble protéger le sperme contre le froid
- le sperme dans les vésicules séminales isolées est résistant aux effets nuisibles du froid. Il résiste d'autant mieux que le corps du mâle est présent.
- le sperme dans la spermathèque isolée montre une motilité étonnamment grande après dégel. Donc le sperme de la spermathèque semble plus résistant au froid et dans ce cas le glycérol ne semble pas effectif dans la protection du sperme.

. Point de vue des chercheurs soviétiques

Les auteurs MELNITCHENKO et VAVILOV ont beaucoup étudié le sujet et sont arrivés à la conclusion que la conservation du sperme de faux bourdons peut se faire par l'azote liquide pendant plusieurs années.

Le sperme est récolté à partir de faux bourdons âgés de 12 à 17 jours. A cet âge le sperme peut être facilement extrait du trajet sexuel et il est plus efficace dans l'insémination artificielle des reines.

Les spermatozoïdes d'une goutte de sperme de faux bourdons non dilué, mis sur une lame non recouverte, maintiennent leur motilité et leur viabilité normales à une température de 22-24° C et une humidité relative de 60-70 % pendant seulement 2 à 4 minutes. A mesure que la goutte sèche, la mobilité des spermatozoïdes diminue pour disparaître ensuite. Il s'ensuit que toutes les opérations nécessitées par l'extraction du sperme et son emploi, que ce soit pour l'insémination artificielle des reines, ou pour la congélation, doivent être effectuées le plus rapidement possible, les conditions de stérilité étant strictement respectées.

Le meilleur diluant de protection du sperme de faux bourdon est l'hémolymphe récoltée dans des tubes capillaires : les pH de sperme et de l'hémolymphe sont pratiquement identiques.

Le sperme de faux bourdons adultes au point de vue sexuel a été congelé sous trois formes :

- prélevé à la surface de l'organe sexuel ou éjaculé librement
- prélevé des vésicules séminales extraites du corps de faux bourdons
- prélevé des vésicules séminales de faux bourdons congelés.

Les spermatozoïdes récoltés par pure éjaculation et ceux prélevés des vésicules séminales sont mis dans de petites canules en verre ou en polyéthylène additionnés de diluant (5-10 % du volume du sperme). Puis ces canules sont introduites dans des éprouvettes ordinaires mises à leur tour dans les éprouvettes de congélation.

Afin de congeler le sperme dans les vésicules séminales des faux bourdons vivants, ceux-ci sont introduits dans de petits paquets, eux-mêmes placés dans des éprouvettes, elles-mêmes introduites dans le récipient de congélation.

La congélation a été obtenue par deux méthodes :

- par congélation graduelle de + 25° C à + 5° C puis à - 5° C et ainsi de suite jusqu'à - 196° C
- par congélation brusque de + 25° C à - 196° C.

Le temps de congélation varie de quelques minutes à plusieurs années. La décongélation a été obtenue par deux procédés :

- par décongélation graduelle de -196°C (en passant par -10° , -5° , $+5^{\circ}\text{C}$) à $+25^{\circ}\text{C}$
- par décongélation brusque de -196°C à $+25^{\circ}\text{C}$.

Les résultats rapportés dans le tableau n° 10 ci-après ont été obtenus lors d'une expérience en 1973.

Nous constatons que, dans tous les cas, la quantité la plus grande de spermatozoïdes viables est conservée par congélation et décongélation brusques. Au contraire, dans le cas de congélation et décongélation graduelles du même sperme, 90 % à 95 % des spermatozoïdes meurent.

La conservation pendant plusieurs années du sperme congelé dans l'azote liquide a été réalisée. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau n° 11 qui nous montre que les différentes périodes de maintien dans l'azote liquide des spermatozoïdes congelés brusquement n'ont pas une influence décisive sur leur viabilité.

Les spermatozoïdes de faux bourdons décongelés brusquement après trois ans de conservation dans l'azote liquide ont été aussi viables que ceux conservés dans l'azote liquide pendant 2 ou 3 jours ou que ceux qui n'ont pas été congelés. Les spermatozoïdes se sont trouvés dans une anaérobiose puissante caractérisée par la diminution au maximum des ressources d'énergie, les diluants se comportent comme une source supplémentaire de nutrition après congélation.

L'une des principales causes de conservation de la viabilité des spermatozoïdes par congélation brusque est le passage de l'eau directement à une forme amorphe sans cristallisation. Les membranes cellulaires ne sont pas affectées au point de vue mécanique. Les constatations en liaison avec la conservation parfaite des spermatozoïdes viables dans les vésicules séminales de faux bourdons sont particulièrement intéressantes au point de vue théorique. Les spermatozoïdes semblent disposer d'un très grand potentiel biologique qui n'est plus maintenu dans les cellules somatiques différenciées. Par conséquent, la conservation du sperme dans les vésicules séminales des faux bourdons congelés présente moins de perspectives que la conservation du sperme dans les vésicules séminales congelées après leur extirpation des organes sexuels des faux bourdons.

D'un point de vue plus pratique, plusieurs colonies ont hiverné et se sont développées dans de bonnes conditions. Il semble donc que la conservation du sperme de faux bourdons pendant plusieurs années par congélation dans l'azote liquide, soit un procédé efficace de perspective et particulièrement important pour le travail pratique de sélection des Abeilles.

TABLEAU n° 9

	Origine du sperme	Traitement	Motilité
1	Sperme	Non dilué	0,4
2	Sperme	Dilué avec une solution de Locke à 7 % de glycérol	1.2
3	Sperme	Dilué avec une solution de Locke à 10 % de glycérol	0.3
4	Vésicule séminale isolée	—————	3.1
5	Vésicule séminale isolée	Suspension dans une solution de Locke contenant 7 % de glycérol	3.3
6	Vésicules séminales dans un mâle	—————	3.7
7	Spermathèque isolée	—————	4.0
8	Spermathèque isolée	Suspension dans une solution de Locke contenant 7 % de glycérol	4.2
9	Spermathèque dans une reine d'abeilles	—————	4.4

TABLEAU n° 10

Viabilité des spermatozoïdes de faux-bourçons après congélation dans
de l'azote liquide (diluant : hémolymph)

Etat du sperme	Temps de congélation	Congélation	Décongélation	Viabilité des spermatozoïdes %
Éjaculé librement	60 minutes	rapide	rapide	93-93
	60 minutes	graduelle	graduelle	0-8
	15 jours	rapide	rapide	75-80
	15 jours	rapide	graduelle	5-10
Vésicules séminales excisées du corps des faux-bourçons	60 minutes	rapide	rapide	83-95
	60 minutes	graduelle	graduelle	2-10
	10 jours	rapide	rapide	90-92
	10 jours	graduelle	graduelle	0-9
Vésicules séminales dans le corps des faux-bourçons congelés	60 minutes	rapide	rapide	75-80
	60 minutes	graduelle	graduelle	0-2
	10 jours	rapide	rapide	70-74

TABLEAU n° 11

Viabilité des spermatozoïdes de faux-bourçons après différentes périodes
de conservation dans de l'azote liquide
(Sperme dans les vésicules séminales)

Période de conservation	1971 (VII)	1971-1972 (VII)	1971-1973 (VII)	1971-1974 (VII)
Viabilité des spermatozoïdes	100 %	26,2 %	95,8 %	95,6 %

CHAPITRE TROISIEME

TECHNOLOGIE DE L'INSEMINATION ARTIFICIELLE

-1-

A - Appareil d'insémination artificielle

Le succès de l'utilisation de l'Insémination Artificielle à grande échelle et de façon courante est directement lié à la simplicité et à la sûreté de fonctionnement de l'appareil. Nombreux furent les appareils proposés mais seuls ceux de MACKENSEN et ROBERTS, de LAIDLAW, puis de RUTTNER SCHNEIDER et FRESNAYE, purent répondre à ces exigences. Ce dernier est pratiquement le seul appareil utilisé en France : nous ne nous référerons qu'à ce type testé avec d'excellents résultats.

L'appareil standard pour l'Insémination Artificielle des reines d'abeilles comporte les éléments principaux suivants :

- un socle avec la plaque basale et deux colonnes porte-outils servant de supports
- un dispositif de contention de la reine avec le tuyau à gaz et le bloc de logement de la reine.

Le logement de la reine est un tube en matière plastique transparente mesurant 6,6 mm de diamètre à l'une de ses extrémités et 4,8 mm à l'autre. A cet endroit la paroi intérieure est pourvue de trois rainures longitudinales laissant échapper le gaz carbonique. Pour introduire la reine dans ce support, nous nous servons d'un tube de diamètre 6,6 mm dont une extrémité est obturée. Après avoir introduit la reine dans le tube nous coiffons l'extrémité ouverte par le support : la reine ne pouvant plus progresser fait marche arrière et vient prendre place dans le logement prévu en laissant apparaître les derniers tergites et sternites. Nous fixons ensuite le support sur la plaque de fixation qui elle-même se place sur la plaque basale par l'intermédiaire de tenons.

- un crochet dorsal et un crochet ventral fixés sur les colonnes porte-outils du socle avec liberté de mouvement dans toutes les directions. Ils doivent s'adapter exactement à l'anatomie de la reine : de leur finition et de leur précision dépend la facilité d'introduction de la pointe dans l'oviducte médian.
- un bloc seringue pour la fixation et la manipulation mécanique de la seringue.
- une seringue à pointe en verre ou en plexiglas.

C'est un des éléments les plus importants de l'appareil de l'Insémination Artificielle. La seringue la plus fréquemment utilisée a été mise au point par MACKENSEN en 1948 : l'aspiration ou l'évacuation du sperme est réalisée par des changements de pression provoqués par les mouvements d'une membrane de caoutchouc.

La pointe de MACKENSEN est fabriquée dans une tige de plexiglas de 8 mm de diamètre fileté et percée d'un canal de 0,15 mm de diamètre. Une fois la pointe calibrée, elle est graduée en microlitres : la contenance est généralement de 10 micro litres.

Avant d'introduire la pointe dans l'oviducte médian il est nécessaire de soulever la valvule vaginale à l'aide d'une sonde. Cet instrument à la forme d'un crochet court en fil de laiton fixé à un manche. La pointe longue de 1 mm est tordue en tire bouchon à 20-25 degrés dans le sens des aiguilles d'une montre par rapport à la main de l'opérateur. La finition doit être parfaite de façon à éviter toute blessure de la reine.

- une bouteille de gaz carbonique à haute pression raccordée par des tuyaux au bloc du logement de la reine et au verre pour l'anesthésie.

B - Technique

L'Insémination Artificielle, sensu stricto, comporte plusieurs opérations :

- tout d'abord la préparation de l'anesthésie, de la seringue, puis de la reine
- ensuite le remplissage de la seringue
- enfin l'injection de sperme dans l'oviducte médian après avoir récliné la valvule vaginale.

1°) Préparation

a) de l'anesthésique

Le tuyau d'admission du gaz carbonique est fixé au petit tube du bloc de contention de la reine. Le débit doit être juste assez abondant pour calmer la reine.

b) de la seringue

Préparer la seringue consiste à remplir la pointe de liquide. L'eau étant nocive aux spermatozoïdes, nous utilisons une solution physiologique à 0,9% de NaCl. Certains auteurs conseillent la mise en solution de streptomycine dans le liquide physiologique.

Nous remplissons la pièce intermédiaire vissée dans le corps métallique de la seringue en ayant pris soin d'ajuster la rondelle de caoutchouc. Puis nous vissons la pointe dans la pièce intermédiaire. Nous manoeuvrons le piston : la quantité de liquide chassé est fonction de la quantité de sperme que l'ont veur récupérer. Bien que cette solution soit mieux tolérée, il est conseillé de laisser une petite bulle d'air de façon à éviter le contact liquide sperme. Puis la seringue est fixée à l'appareil et ajustée de telle façon que la pointe ne gêne pas lors de la préparation de la reine.

c) de la reine

La reine est placée dans son logement (cf A). Nous admettons le gaz carbonique et l'anesthésie ne tarde pas à s'installer : en début d'anesthésie l'abdomen de la reine fait quelques "mouvements profonds" d'inspiration, puis elle devient parfaitement immobile même quand on la touche. Quand le débit est trop fort nous constatons une dilatation anormale de l'abdomen par gonflement des sacs trachéens.

La reine est placée de façon adéquate si trois conditions sont réalisées :

- les pattes postérieures restent à l'intérieur du logement
- les trois derniers segments apparaissent à l'ouverture de logement
- la face dorsale est tournée à droite. Pour réaliser un travail de qualité, une loupe binoculaire est nécessaire.

Quand la reine est calme nous engageons les crochets de fixation : le crochet ventral à gauche puis le crochet dorsal dans la gaine de l'aiguillon et nous écartons ensuite les sternites abdominaux. Le crochet dorsal est maintenu dans l'espace triangulaire entre les bases des soies de l'aiguillon afin d'éviter que les tissus ne se dessèchent pendant le remplissage de la seringue.

FIGURE n° 8

Appareil standard pour l'insémination des reines d'abeilles

KH - Bloc du logement de la reine ; Sp - Bloc de la seringue ; Sta - Socle
VH, SH - Crochets ventral et dorsal.

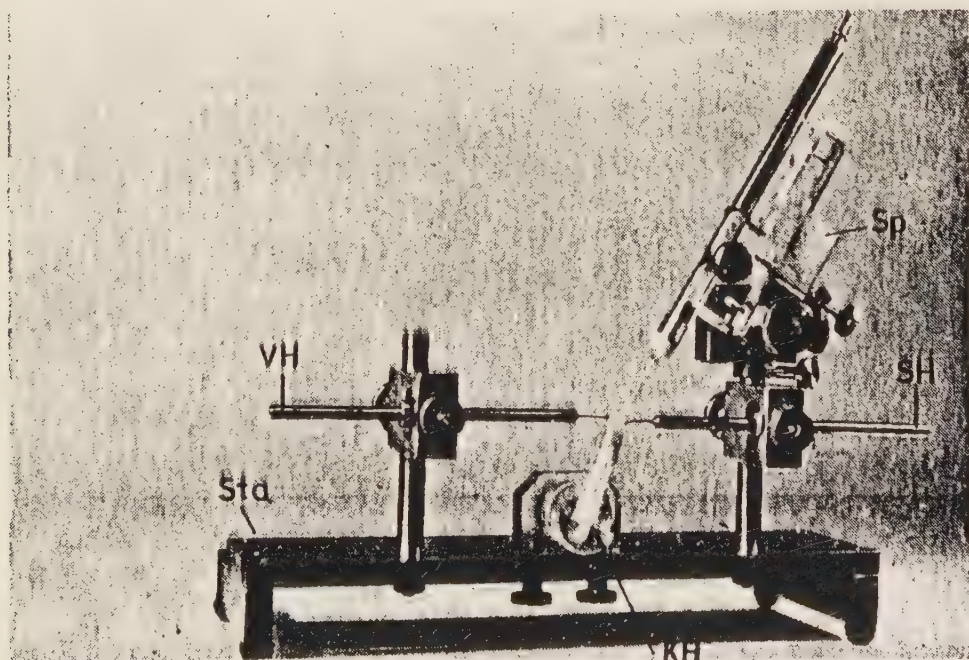


FIGURE n° 9

Dispositif de contention de la reine

A - Plaque de fixation ; G - Tuyau à gaz ; KH - Appareil de contention de la reine ; M - Erou ; P - Plaque basale ; S - Rondelle ; St - Arrêt ;

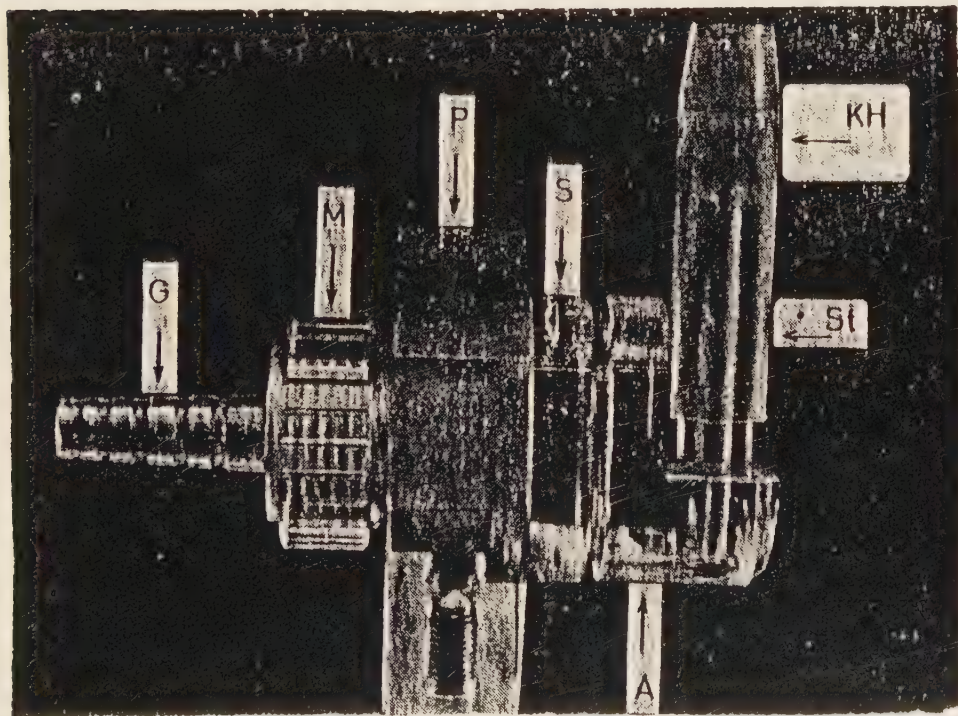


FIGURE n° 10

Crochet ventral (à gauche) et crochet dorsal (à droite)

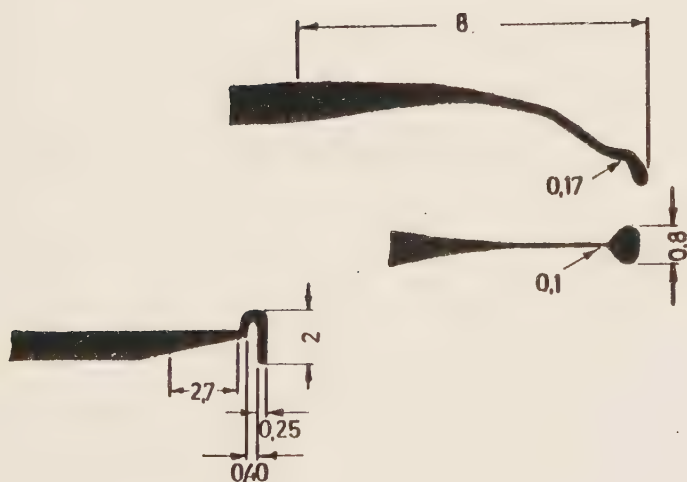


FIGURE n° 11

Seringue d'insémination selon MACKENSEN

Matière : acier V2A. Pour pouvoir utiliser les pointes provenant des USA on a conservé le pas américain

A - Piston ; B - Corps de la seringue ; C - Tige mobile ; D - Manchon - raccord en plexiglas (socle de la pointe) ; E - Membrane de caoutchouc, 6,5 x 2 ; F - Pointe en plexiglas.

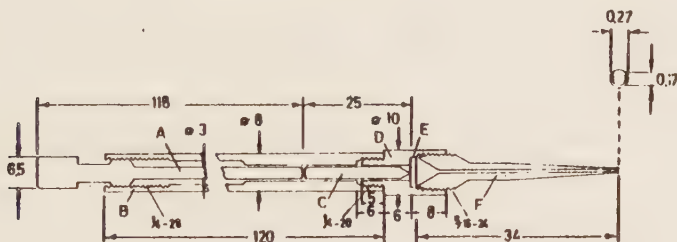
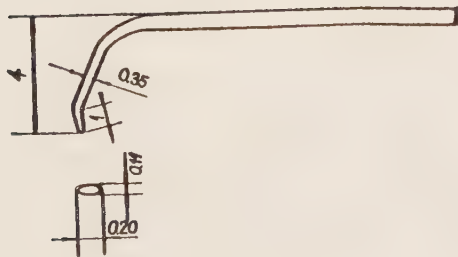


FIGURE n° 12

Sonde vaginale



2°) Remplissage de la seringue

Ce sujet a déjà été traité au II A 3ème dans Technique de Collecte. Nous ne développerons pas à nouveau ce sujet. Il est néanmoins nécessaire de rappeler qu'il ne faut aspirer ni air ni mucus avec le sperme.

3°) Injection

Avant d'introduire la pointe, nous vérifions que les crochets n'ont pas bougé et que la reine vit. La chambre de l'aiguillon est largement ouverte entre les courbures des soies de l'aiguillon et le dernier sternite.

La paroi dorsale de la gaine de l'aiguillon et celle du vagin se trouvent tendues de manière que la seringue puisse glisser sur toute leur longueur et pénétrer dans l'oviducte moyen.

Puis nous plaçons la pointe de la seringue au dessus de l'orifice du vagin. A l'aide de la main gauche, nous insérons la sonde vaginale dans la partie dorsale du vagin et la valvule vaginale est poussée contre la paroi ventrale jusqu'au point permettant le passage de la seringue. Puis la sonde vaginale est retirée tandis que la seringue pénètre jusqu'à environ 1,5 mm de profondeur.

Le sperme doit être injecté soigneusement. Si le sperme ne se déplace pas immédiatement cela signifie que la seringue n'a pas pénétré dans l'oviducte et qu'elle doit être retirée pour un nouvel essai. L'injection peut être rapidement menée lorsque le sperme se déplace correctement sans fuite autour de la seringue.

Nous pouvons nous passer de la sonde vaginale de la façon suivante : la pointe est orientée directement vers l'orifice du vagin où elle est introduite jusqu'à environ 1,5 mm de profondeur. Puis la pointe est un peu soulevée en tournant la vis de réglage de sorte que si elle continue à être poussée elle passe par devant la valvule vaginale et elle peut glisser dans l'oviducte moyen.

La quantité de sperme injecté dépendra du nombre d'inséminations réalisées par l'opérateur. L'efficacité, c'est-à-dire, le pourcentage de spermatozoïdes atteignant la spermathèque diminue à mesure qu'augmente la quantité de sperme injecté. Dans l'accouplement naturel, WOYNE a mis en évidence que les reines ne cherchent plus à s'accoupler après avoir été fécondées à raison d'en moyenne 5,2 millions de spermatozoïdes dans la spermathèque. Il a d'autre part montré que l'introduction de 8 à 10 micro l de sperme en une injection ou 2 inséminations de 4 micro l chacune se révèlent suffisantes puisqu'elles garnissent la spermathèque de 5,4 millions de spermatozoïdes en moyenne.

MACKENSEN a révélé pour des inséminations uniques de 8 à 10 micro l de sperme des moyennes de 3,2 millions ; pour deux inséminations de 6 micro l de sperme il a compté 4,3 millions de spermatozoïdes. En pratique nous inséminons les reines deux fois avec 6 micro l de sperme. Cette méthode utilisée par les opérateurs de l'I.N.R.A. donne des résultats très satisfaisants.

FIGURE n° 13

A - Réglage de la position de la seringue

1 - Crochet ventral ; 2 - Solution saline ; 3 - Valvule vaginale ;
4 - Air ; 5 - Aiguillon ; 6 - Crochet dorsal.

B - Introduction de la sonde après avoir retiré la seringue

1 - Sonde ; 2 - Valvule vaginale ; 3 - Pointe retirée ; 4 - Spermathèque.

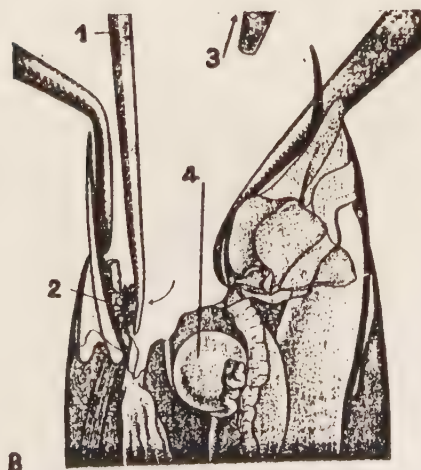
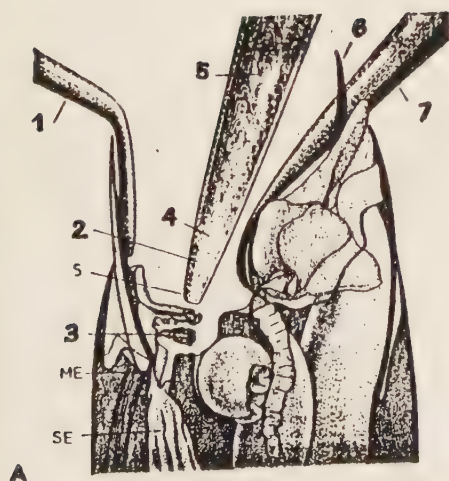


FIGURE n° 13

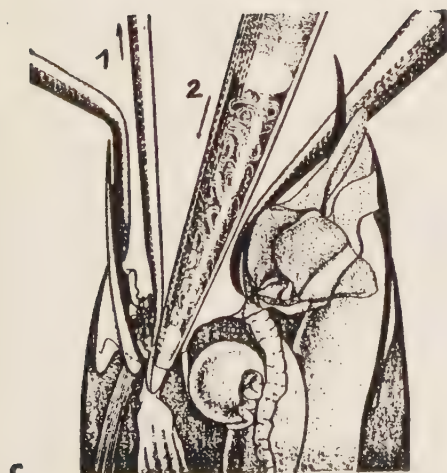
C - Introduction de la pointe par devant la
valvule vaginale

1 - Retrait de la sonde ; 2 - Introduction de la pointe.

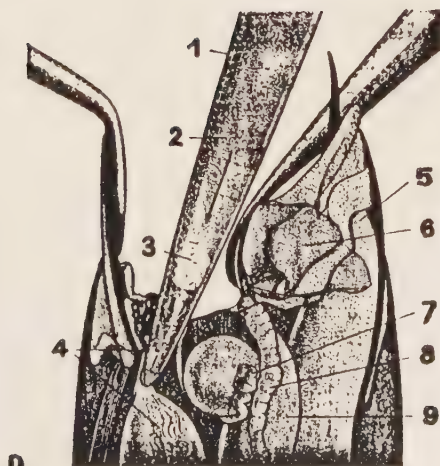
D - La seringue a été poussée jusqu'à 1,5 mm de profondeur
jusqu'à l'oviducte médian

1 - Pointe introduite ; 2 - Solution saline ; 4 - Sperme ; 3 - Air ;
5 - Rectum ; 6 - Gaine de l'aiguillon ; 7 - Glande de la spermathèque ;
8 - Glande annexe ; 9 - Réservoir à venin.

ME, SE - Oviducte médian et latéral ; S - Pointe de
la seringue.



C



D

4°) Conditions aseptiques du travail

La prévention de la propagation de maladies au dehors du Laboratoire passe par l'application de mesures préparatoires :

- désinfecter les cadres et le nucléus de fécondation
- former le nucléus de fécondation avec de jeunes abeilles provenant de colonies saines et fortes
- les nourrir avec du sirop au Fumagil B.

Le Laboratoire d'insémination doit être le siège d'une propreté exemplaire. Le matériel et la table de travail doivent être périodiquement lavés aux détergents. Les doigts entrent souvent en contact avec les excréments de faux bourdons : ce sont des sources très dangereuses d'infection. Il faudra donc travailler avec du matériel stéril et des mains aseptisées. Le sperme ne supporte pas le contact avec les détergents et l'alcool à 90° ainsi le matériel sera rincé minutieusement avec de l'eau stérile avant utilisation. Lors du remplissage de la seringue, tout sperme en contact avec les excréments ou l'hémolymphe sera obligatoirement rejeté.

Il est important de nettoyer attentivement tous les ustensiles, les pointes surtout, à la fin d'une journée de travail car toute trace de mucus dans la pointe est un milieu de culture pour la multiplication massive des bactéries. Les restes de mucus ne se détachant pas sont écartés à l'aide d'un fil métallique mais il suffit généralement de rincer la pointe et de l'introduire dans une solution antiseptique.

Nous obtenons une bonne stérilisation des instruments en verre et métal en utilisant une lampe à ultra violets.

Le fort pourcentage de perte de reines après insémination artificielle s'explique en partie par le non respect de ces règles de base.

5°) Emploi de gaz carbonique

Le gaz carbonique ne sert pas uniquement à anesthésier la reine mais il l'incite également à pondre. Selon MACKENSEN, des reines vierges et des reines inséminées commencent à pondre pratiquement aussi tôt que les reines fécondées par accouplement. Sans ce traitement 20 % des reines commencent à pondre avant le 30ème jour suivant leur éclosion. Deux anesthésies à 24 heures d'intervalle sont suffisantes pour déclencher la ponte. Ces traitements ne semblent pas avoir d'effets néfastes mais il convient de les réduire au minimum strict tant que l'on ne connaît pas mieux les répercussions qu'ils ont sur les reines. Il est à noter que le gaz carbonique accélère le vieillissement des abeilles ouvrières. La dose minimale efficace n'a pas été déterminée, mais il semble que l'on puisse réduire à la fois la durée du traitement et l'intervalle entre ces traitements.

6°) Techniques complémentaires

a) Insémination des reines en cours de ponte

On recourt à cette méthode lorsqu'une reine est accouplée à des mâles de sa propre souche pour obtenir un haut degré d'endogamie. L'induction de la ponte de la reine vierge se fait grâce au gaz carbonique. Quand les mâles sont adultes elle est extraite de la ruche et placée pendant quelques jours dans une cage d'expédition de reines en compagnie de quelques ouvrières afin d'atrophier ses ovaires. Puis elle est inséminée de la manière habituelle et avec de petites quantités de sperme. Les reines inséminées avec deux injections de 3 micro l de sperme pondent toutes 100 % d'oeufs fécondés.

b) Insémination avec du sperme provenant d'une spermathèque

CALE et GOWEN (1964) furent les premiers à appliquer cette technique dans la pratique. Ils inséminèrent d'abord une reine avec le sperme d'un seul mâle puis une fille avec du sperme provenant de la spermathèque de la mère et enfin une petite fille avec du sperme de la grand mère. DE cette façon ils constituèrent en 12 semaines 6 lignées endoganes avec un coefficient de consanguinité voisin de 95 %.

c) Sperme en provenance de vésicules séminales

Il est parfois souhaitable de pouvoir obtenir du sperme provenant directement des vésicules séminales par exemple quand on veut se procurer du sperme d'un seul mâle mutant ne parvenant pas à éjaculer. Après avoir entaillé et découpé les tergites, on tranche soigneusement et lentement les vésicules mises à nu. Si l'on serre à l'aide d'une pince fine à proximité de l'extrémité des testicules on déclenche une contraction péristaltique qui expulse le sperme que l'on aspire dans la seringue. Selon MACKENSEN (1955) le sperme ainsi recueilli n'est pas aussi efficace que celui recueilli par éversion et éjaculation.

C - Résultats

1°) Nombre de reines pondeuses après insémination

Le succès de l'insémination est d'abord mesuré par le nombre de reines qui subsistent au début de ponte. Si l'opération a été menée avec soin plus de

90 % des reines parviennent à ce stade. Ce résultat est supérieur à celui que l'on peut attendre de l'accouplement naturel. Au fur et à mesure que s'avance la saison, les chiffres sont généralement moins élevés mais la cause est à rechercher dans la situation générale de la colonie d'abeilles. En fin de miellée, les abeilles manifestent plus d'agressivité envers la reine et beaucoup de pertes sont dues à l'installation des colonies dans un espace trop restreint. On estime pendant toute la saison avoir une moyenne de 70 à 80 % de reines pondeuses.

2°) Degré de remplissage de la spermathèque

Le degré d'efficacité de l'insémination est inversement proportionnel à l'augmentation de la quantité de sperme. L'augmentation de la quantité de sperme injecté fait augmenter le nombre de spermatozoïdes dans la spermathèque, mais d'autant plus lentement que la quantité de sperme injecté augmente.

Si l'on insémine 1 micro l il en pénétrera 20 % dans la spermathèque, mais la proportion n'est plus que de 9 à 13 % pour 4 micro l de 4 à 8 % pour 10 micro l et seulement de 18 % pour 36 micro l (MACKENSEN 1964). Il est donc avantageux de diviser la quantité de sperme à injecter en 2. C'est ce qu'a réalisé MACKENSEN en inséminant les reines 2 fois avec 6 micro l de sperme à 1 ou 2 jours d'intervalle.

Mais l'insémination répétée de petites doses entraîne, outre les risques propres à chaque insémination, un travail supplémentaire.

Les conditions d'entretien influencent essentiellement le degré de remplissage de la spermathèque. Les grandes reines élevées à partir de larves très jeunes ont la spermathèque mieux remplie (WOYKE 1971), la température élevée après insémination et un nombre suffisant d'abeilles nourrices favorisent le remplissage de la spermathèque (FOTI 1973).

Après une double insémination certaines reines peuvent encore prendre leur envol et s'accoupler. Le nombre de spermatozoïdes n'est donc valable comme preuve de succès de l'insémination que si le vol nuptial de la reine a été empêché.

3°) Rendement en miel et longévité

Avant de pouvoir comparer des reines fécondées artificiellement et des reines fécondées naturellement, il convient de bien maîtriser une bonne méthode d'insémination artificielle. Il serait absurde de comparer des reines fécondées par accouplement à des reines mal inséminées artificiellement. ROBERTS, à la suite d'une expérience menée à bien, fournit un bon exemple d'information exploitable. Des reines de groupes distincts furent comparées avec des demi soeurs accouplées dans une station de fécondation bien isolée. Aucune différence significative ne fut relevée entre les deux

groupes quant à la quantité et la qualité de couvain. Pour la production du miel, nous pouvons attendre des reines fécondées par Insémination Artificielle des rendements tout aussi élevés que ceux de leurs soeurs fécondées par accouplement.

Des reines correctement inséminées produisent un nid à couvain entièrement operculé et peuvent vivre aussi longtemps que des reines fécondées par accouplement. Les exemples sont nombreux : en 1974 un apiculteur de la Hesle a présenté sa plus forte colonie dont la reine avait été inséminée artificiellement en 1971.

Il semble cependant en moyenne générale que les reines fécondées par accouplement vivent un peu plus longtemps, mais cette différence ne peut être prise en compte qu'à la fin de la première année de vie.

Ces résultats prouvent de façon convaincante que l'Insémination Artificielle contribuera beaucoup au développement ultérieur de l'apiculture : c'est un chafnon important de l'élevage général.

- o o o -

C O N C L U S I O N

=====

De ce travail, plusieurs points méritent d'être relevés :

- l'abeille reste un matériel génétique de choix tant sur le plan didactique que sur le plan pratique : les chercheurs de l'I.N.R.A. nous le prouvent par cette manipulation génétique qui est la triple hybride
- la technologie de l'Insémination Artificielle est maintenant bien au point, mais patience, minutie et propreté restent les clés du succès.
- la conservation du sperme de faux-bourçons n'est pas parfaite. Trouver une explication cohérente du maintien en survie des spermatozoïdes dans la spermathèque et recréer les conditions naturelles en vue de leur conservation ont fait l'objet de nombreuses recherches, mais il semble qu'aucune n'ait réellement abouti.

L'Insémination Artificielle représente un moyen de contrôle efficace dans plusieurs domaines : accouplement, méthodes de sélection, élevage d'abeilles vérifiées, perfectionnement des techniques apicoles nécessitées par l'amélioration du cheptel. Les apiculteurs prennent conscience petit à petit de l'existence de cette nouvelle méthode. Nous espérons voir d'ici quelques années l'ouverture de plusieurs centres d'insémination de reines d'abeilles, réellement effectifs.

- o o o -

Vu :
LE DIRECTEUR

de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,

LE PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'École Nationale Vétérinaire,

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 27 FEV. 1981 19

l'Administrateur provisoire
de l'Université de Lyon I

D. GERMAIN

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - CHAUVIN R. (1968)
Traité de Biologie de l'Abeille - Biologie appliquée
Tome 4 - p 204-211

- 2 - CONCEICAO APARECIDA DE CAMARGO (1975)
Biology of the spermatozoon of *Apis Mellifera* Influence
of diluents and pH - Journal of Apicultural Research
14 (3-4) - p 113-118

- 3 - CONCEICAO APARECIDA DE CAMARGO (1970)
Conservação de espermatozoide de *Apis Trigona*
1er Cong. bras. Apic. Florianopolis
p - 51-54

- 4 - CORNUET J.M. (1978)
Contrôle génétique des Hybrides interraciaux
d'*Apis Mellifica* L.
Apidologie 2 (3) - p 195-202

- 5 - FRESNAYE J. et LAVIE P. (1977)
Sélection et hybridation de l'Abeille en France
XXVI Congrès International d'Apiculture d'Apimondia
p 235-241

- 6 - FRESNAYE J. et LAVIE P. et BOESIGER E. (1974)
La variabilité de la production du miel chez l'Abeille
de race noire (*Apis mellifica mellifica*) et chez
quelques hybrides interraciaux
Apidologie 2 (1) - p 1-20

- 7 - HARBO J.R. (1974)
A technique for handling stored semen of honey bees
Ann. Entomol. Soc. Amer.
67 - p 191-194

- 8 - HARBO J.R. (1975)
Measuring the concentration of spermatozoa from honey
bees with spectrophotometry
Ann. Entomol. Soc. Amer.
68 - p 1050-1052

- 9 - HARBO J.R. (1976)
Survival of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen
Ann. Entomol. Soc. Amer.
70 (2) - p 257-258

- 10 - HARBO J.R. (1977)
Storing honey bee - Agricultural Research
25, 8 - p 12-13

- 11 - JAYCOX E.R. (1960)
The effect of drying and various diluents on spermatozoa
of the honey bee (*Apis Mellifera* L.)
Journal of economic Entomology
53 (2) - p 266-269
- 12 - LAIDLAW H. (1973)
L'insémination instrumentale dans l'Apiculture industrielle
XXIV Congrès International d'Apiculture d'Apimondia
p 298-300
- 13 - LENSKY SCHINDLER H. (1967)
Motility and reversible inactivation of honey bee
spermatozoa in vivo and in vitro
Annales de l'Abeille
10 (1) - p 5-16
- 14 - MARIA ALICE DA CRUZ HOFLING, CARMINDA DA CRUZ LANDIM and
E.W. KITAJIMA (1970)
The fine structure of spermatozoa from honey bee
An. Acad. Brasil. Cienc.
42 (1) - p 69-78
- 15 - MELNITCHENKO A.N. VAVILOV I.L. (1975)
Conservation du sperme de faux bourdons par congelation
dans l'azote liquide pendant plusieurs années
XXV Congrès International d'Apiculture d'Apimondia
p 330-335
- 16 - MURRAY S. BLUM, J.E. BUMGARNER and S. TABER III (1967)
Composition and possible significance of fatty acids in
lipid classes in honey bee semen
J. Insect. Physiol. Vol. 13 - p 1301-1308
- 17 - NOVAK A.F., BLUM M.S., TABER S. III and LUIZZO J.A. (1960)
Separation and determination of seminal plasma an sperm
amino-acids of honey bee, *Apis Mellifera*
Ann. entomol. Soc. Amer.
53 - p 841-843
- 18 - POOLE H.K. and S. TABER (1969)
A method of in vitro storage of honey bee semen
American bee Journal November
p - 420-421
- 19 - POOLE H.K. and S. TABER (1970)
In vitro preservation of honey bee semen enhanced by
storage at 13°-15° C
Annals of Entomological society of America
63 (6) - p 1673-1674
- 20 - RUTTNER F. (1976)
Insémination Artificielle de la reine d'Abeilles
- 21 - TABER III S. (1961)
Successful shipment of honey bee semen *Bee World*
42 - p 173-176

- 22 - TABER III S. (1977)
Semen of *Apis mellifera* fertility, chemical and physical characteristics
Adv. Invertebrate Reproduction
Vol. 1 - p 219-251
- 23 - TABER III S., POOLE and J.F. EDWARDS. (1979)
Enhanced fertility of honey bee semen stored in vitro and possibly a reversal of senescence
Apidologie
10 (2) - p 129-136
- 24 - VERMA L.R. (1973)
An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honey bee (*Apis mellifera* L.)
Comp. Biochem. Physiol.
44 A - p 1325-1331
- 25 - VERMA L.R. (1973)
Respiratory metabolism of the semen of the honey bee *Apis mellifera*
J. Insect Physiol.
19 - p 97-103
- 26 - VERMA L.R. (1974)
Honey bee spermatozoa and their survival in the queen's spermatheca
Bee World
55 (2) - p 53-61
- 27 - VERMA L.R. (1976)
L'effet des ions du liquide de la spermathèque et du stockage sur la consommation d'oxygène et sur la motilité des spermatozoïdes d'abeilles mellifères
XXVI Congrès International d'Apiculture d'Apimondia Moscou 1977
p 120-128
- 28 - YOSHIKI SAVADA and M.C. CHANG (1964)
Tolerance of honey bee sperm to deep freezing
Journal of Economic Entomology
p 891-892

